

Entwicklung neuer Mausmodelle zur Untersuchung von Infektionskrankheiten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Martin König

geboren am 13.02.1976, in Wiesbaden

2009

Referent: Prof. Dr. Ulrich Kalinke
Korreferent: Prof. Dr. Reinhold Förster
Tag der Promotion: 30.06.2009

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Entwicklung neuer Mausmodelle zur Untersuchung von Infektionskrankheiten“ selbstständig angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen, Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2003 bis September 2007 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen, unter der Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Kalinke angefertigt.

Ich erkläre, dass diese Dissertation, weder in gleicher noch in anderer Form, in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Außer den, mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Wiesbaden, den 5. Juli 2009

Martin König

1 Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein schlagkräftiges Instrument zur Bekämpfung von Infektionen, in dem es Pathogene identifiziert und eliminiert, um somit den Organismus zu schützen. Dabei spielt die Differenzierung von fremden und gefährlichen Strukturen, sowie die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd eine entscheidende Rolle. Die Mechanismen der immunologischen Toleranz und Autoimmunität sind bisher nur ungenügend verstanden. Vor allem im Hinblick darauf, dass immuntherapeutische Ansätze gegen Selbst-Determinanten wie das Prion-Protein (PrP) im Falle der Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJD) oder der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) aber auch Amyloid-ähnliche Protein-Ablagerungen bei der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit in Betracht gezogen werden, ist es von enormer Bedeutung *in vivo* Modelle zur Untersuchung von Immuntoleranz und Autoimmunität zu generieren. Ein Projekt dieser Arbeit stellte die Generierung eines neuen Mausmodells dar, dass die Analyse der B Zell-Toleranz und potentielle Autoimmunität gegenüber der Selbst-Determinante PrP erlauben sollte. Das neue Mausmodell sollte mittels zielgerichteten Mutagenese (*Gene-Targeting*) in murinen embryonalen Stammzellen (ES Zellen) hergestellt werden. Die verwendete Targeting-Strategie basiert auf der Ersetzung der endogenen J_H-Elemente und des letzten D-Elements im genomischen Immunglobulin (Ig)-schwere Kette Locus durch eine Kasette, welche zwei zueinander invers orientierte, rearrangierte V_H-Regionen zweier verschiedener Antikörper enthält. Mäuse, die aus derart veränderten ES Zellen abstammen, entwickeln B Zellen die zunächst die schwere Kette des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV)-spezifischen Antikörpers KL25 exprimieren. In einem nächsten Schritt können V_HKL25/V_H6H4flox-Mäuse mit einer induzierbar Cre-exprimierenden Mauslinie gekreuzt werden. Nach Induktion der Cre-Expression kann die loxP-flankierte Kasette invertiert werden, was zur Expression der schweren Kette des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4 führt, während die Expression der V_HKL25 gestoppt wird. In dieser Arbeit konnten hierzu insgesamt 4 unabhängige Stammzellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt durch homologe Rekombination in den IgH-Lokus integriert hatten. Die resultierenden ES Zell-Klone wurden anschließend zur erfolgreichen Mikroinjektion in murine Blastozysten verwendet, wobei mehrere hochchimäre Tiere auf unterschiedlichen genetischem Hintergrund erzeugt werden konnten. Eine erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens und die Generierung vollständig transgener Tiere konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Während wesentliche Elemente des Immunsystems notwendig sind, um eine periphere Prionen-Infektion in das zentrale Nervensystem zu transportieren, kann die Störung verschiedener Komponenten des Immunsystems eine mehr oder minder starke Resistenz gegenüber Prioneninfektionen bedingen. Die korrekte Struktur und Architektur der lymphatischen Organe spielt aber nicht nur für den Verlauf einer Prioneninfektion eine entscheidende Rolle, sondern ebenfalls bei der Eliminierung von konventionellen Pathogenen. Der $LT\alpha\beta$ - $LT\beta R$ (Lymphotoxin α/β -Lymphotoxin β -Rezeptor) Signalweg ist dabei unentbehrlich für Entwicklung, Differenzierung und Erhaltung sekundärer lymphatischer Organe. Um den Einfluss der Struktur lymphatischer Organe auf die Immunantwort und die Pathogenese bei Virusinfektionen zu untersuchen, wurden Experimente mit $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Injektionen mit subletalen Dosen Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen zu WT-ähnlichen humoralen Immunantworten und einem Antikörper-vermittelten Langzeitschutz führte, sodass weder die Ablation von $LT\alpha$, noch die gestörten lymphoiden Strukturen die Ausbildung von effektiven B Zell-Antworten und B/T Zell-Interaktionen nach einer VSV Infektion beeinträchtigen. Somit waren keine Unterschiede in der Immunkompetenz zwischen WT und $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen nach einer Infektion mit dem starken Antigen VSV zu erkennen. Daraus ergab sich die Frage, inwieweit eine gestörte lymphatische Architektur die Antikörper-Antworten bei der Verwendung von schwächeren Antigenen beeinflusst? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mäuse mit replikationsdefizienten, Virus-ähnlichen Partikeln welche das VSV-G-Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren (VLP-VSV) immunisiert. Nach Immunisierung von WT-Mäusen konnte das hohe immunogene Potential von VLP-VSV gezeigt werden, wobei eine starke IgM-Antwort und ein T Hilfe-abhängiger Isotypwechsel zu IgG ausgelöst wird. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die Immunisierung mit VLP-VSV in WT-Mäusen zur Generierung eines VSV-spezifischen immunologischen Gedächtnisses führt. In $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ Tieren konnte interessanterweise kein Wechsel zum IgG-Isotyp nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die Expression des $LT\alpha\beta$ -Transgens auf T Zellen nicht ausreichend, um den Isotypwechsel zum IgG zu induzieren und ein VSV-spezifisches immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Mikroarchitektur der lymphatischen Organe und anderer LT-abhängigen Elemente scheinen somit notwendig zu sein um eine IgG-Antwort gegen VLP-VSV zu induzieren. Zusammengefasst weisen die Resultate darauf hin, dass weder der LT-Signalweg, noch die exakte Architektur lymphoider Gewebe für die Induktion von effektiven Immunantworten gegen ein starkes Antigen wie replizierendes VSV absolut notwendig sind, da VSV über diverse *pattern recognition*

receptors erkannt werden kann. Die parallele Aktivierung verschiedener Signalwege könnte, trotz gestörter lymphatischer Strukturen, die Induktion von effizienten Immunantworten gegenüber VSV-Infektionen sicherstellen. VLP-VSV dagegen stellt ein nichtreplizierendes Antigen dar, welches auf Grund des Fehlens „fremder“ Nukleinsäuren vermutlich nicht die parallele Aktivierung verschiedener Signalwege auslösen kann. In $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen werden die Interaktionen von Immunzellen, wie z.B. zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T Zellen, sowie T und B Zellen vermutlich derart behindert, dass hier die gestörte Struktur der lymphatischen Organe nur eine eingeschränkte Immunantwort gegen schwache Antigene zulässt.

Lymphotoxin α ($LT\alpha$) und Tumornekrosefaktor α ($TNF\alpha$) sind zwei Vertreter der TNF/TNFR-Superfamilie, welche essentielle Funktionen in der Regulierung und der Aktivierung des Immunsystems bei bakteriellen und viralen Infektionen ausüben. Um die Rolle von $TNF\alpha$ und dessen Adaptorprotein TRADD für die Immunantwort nach einer Virusinfektion zu untersuchen, wurden $TNF\alpha^{-/-}$ und $TRADD^{-/-}$ Mäuse mit VSV infiziert. Auf Grund der Tatsache das sowohl die Produktion von $IFN\alpha$, als auch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern nicht beeinträchtigt zu sein scheint, ist es $TNF\alpha^{-/-}$ und $TRADD^{-/-}$ Tieren möglich, eine VSV-Infektion unter Kontrolle zu bringen. Die hier erhaltenen Daten zeigen, dass die Deletion von TRADD zu einer stark verminderten Produktion von $IFN\beta$ führten. Die durch RIG-I vermittelte Erkennung von VSV und die anschließende Produktion von $IFN\beta$ scheinen durch die Eliminierung von TRADD stark beeinträchtigt zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten konnten somit dazu beitragen TRADD als wichtige Komponente für die Induktion von Typ I IFN im RIG-I vermittelten antiviralen Signalpfad zu identifizieren.

Die Induktion von Typ I Interferonen stellt eine frühe und essentielle Antwort der angeborenen Immunität nach vielen verschiedenen Virusinfektionen dar. Um den Einfluss der Typ I IFN-Rezeptorstimulation auf der Ebene myeloider Zellen bei einer Virusinfektion zu untersuchen, wurde ein neues Mausmodell ($LysMcre-IFNAR^{flox/flox}$) verwendet, in dem der Interferonrezeptor (IFNAR) auf myeloiden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten deletiert ist. Die ersten Ergebnisse weisen dabei auf die funktionale Deletion des IFNAR auf Zellen der myeloiden Linie im neuen $LysMcre-IFNAR^{flox/flox}$ Mausmodells hin. Während die *i.v.* Infektion mit geringen Mengen VSV trotz eines nicht-funktionales Interferonsystems in myeloiden Zellen toleriert wird, scheinen

unabhängig der gewählten Route, bei mittleren und hohen Dosen injiziertem VSV, die Einflüsse von Typ I Interferon auf myeloide Zellen, im Besonderen auf Makrophagen, einen entscheidenden Beitrag zur Eliminierung der Infektion zu leisten. Die Tatsache, dass in *LysMcre-IFNAR^{flox/flox}* Mäusen WT-ähnliche Antikörperantworten nach einer VSV Infektion hervorgerufen werden, die Tiere jedoch einen VSV-sensitiven Phänotyp aufweisen und frühzeitig versterben, zeigt die entscheidende Bedeutung eines funktionalen Interferonsystems auf myeloiden Zellen bei der Abwehr von VSV-Infektionen. Gewebespezifische Makrophagen scheinen dabei notwendig zu sein, um eine lokale VSV-Infektion zu kontrollieren. Die Deletion des IFNAR auf Makrophagen führt zu einer stark verminderten Virus-Eliminierung und zu einem veränderten Virustropismus. Auch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern kann die längere Persistenz des Virus nicht verhindern, welche vermutlich die anschließende letale Infektion des ZNS begünstigt. Die Daten dieser Arbeit weisen auf einen entscheidenden Beitrag von Makrophagen-produziertem Typ I Interferon bei der Eliminierung von peripheren VSV-Infektionen hin und demonstrieren die Bedeutung von lokalen antiviralen Zellen bei dem natürlichen Verlauf einer Virusinfektion.

Die zentrale Rolle von Typ II Interferonen wie IFN γ bei der Kontrolle von intrazellulären Pathogenen und der Entwicklung von effektiven adaptiven Immunantworten ist seit langem unzweifelhaft nachgewiesen. Jedoch ist der zelluläre Ursprung von IFN γ während den verschiedenen Phasen einer Infektion nur gering definiert. Um die Rolle des von unterschiedlicher Zelltypen gebildeten IFN γ in der Immunabwehr von Pathogenen zu untersuchen, sollte hierzu ein neues Mausmodell generiert werden, in dem eine Zelltyp-spezifische Rekonstitution der IFN γ -Expression ermöglicht wird. Unter Verwendung der generierten Mauslinien kann somit die Rolle von konditionell exprimiertem IFN γ in der Pathogenese verschiedenster Virus-Infektionen analysiert werden. Des Weiteren bietet das neue Mausmodell zahlreiche neue Möglichkeiten zur Analyse von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose (MS). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das klonierte und durch analytische Restriktionen und Sequenzierung verifizierte Targeting-Konstrukt, mittels *gene targeting* stabil in ES Zellen eingebracht werden. Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in den genomischen IFN γ -Lokus wurde erfolgreich verifiziert. Insgesamt konnten hierbei 4 unabhängige ES Zellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt in den IFN γ -Lokus integriert haben. Parallel dazu wurde die von loxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette in zunächst 5 Subklone von positiven ES Zell-Klonen durch transiente Expression der Cre-Rekombinase deletiert. Der Subklon

7_22_37 wurde anschließend am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig in C57Bl/6 Blastozysten mikroinjiziert. Nach Generierung 11 chimärer Mäuse konnte durch Verpaarung mit WT-Tieren die erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens erreicht werden und somit ein vollständig transgener Nachkomme erzeugt werden.

Schlagworte: Immunologie, Transgene Mausmodelle, Virusinfektionen

2 Abstract

The immune system is an effective mechanism to protect higher organisms against infections. A critical role in the induction of pathogen-specific immune responses plays the differentiation between foreign- and dangerous-structures as well as the discrimination of self and non-self. So far the mechanisms of immunological tolerance and auto-immunity are only partially understood. Particularly because current immunotherapeutic approaches against self-determinants such as the prion-protein (PrP) in the case of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) or bovine spongiform encephalopathy (BSE) as well as amyloid-like protein-deposits in Alzheimer's disease and Parkinson-disease are considered, it is of utmost importance to generate *in vivo* models to analyze immune tolerance and auto-immunity in greater detail. To get more insight into these topics one project of this thesis was the generation of a new mouse model to analyze B cell tolerance and potential effects of auto-immunity in the context of the self-determinant PrP. By using site-directed mutagenesis (gene targeting) of murine embryonic stem cells the new mouse model was planned to be generated. The targeting strategy was based on the substitution of all endogenous JH-elements und the last D-element of the genomic immunoglobulin (Ig) H-locus by a cassette containing two inversely orientated, rearranged VH-regions of two different antibodies. In the resulting mice, B cells will develop initially expressing the heavy-chain of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-specific antibody KL25. After breeding of these mice with mice expressing Cre-recombinase the loxP-flanked cassette is capable to switch the direction and to bring the heavy-chain of the PrP-specific antibody 6H4 to expression. Here, 4 independent stem cell clones were identified which had integrated the targeting construct by homologous recombination in the IgH-locus. Subsequently, these stem cell clones were successfully microinjected into murine blastocysts whereas several highly chimeric animals of different genetic background were generated. Unfortunately, germline transmission of the transgene and generation of transgenic offspring could not be obtained so far.

While fundamental elements of the immune system are necessary to transport a peripheral prion-infection into the central nervous system, the disturbance of certain components of the immune system can lead to an increased resistance against prion-infection. The correct micro-architecture of lymphoid organs plays a critical role not only to promote the progression of prion infections but rather to eliminate conventional pathogens. In this context, the LT α β -LT β R (Lymphotoxin α/β -Lymphotoxin β -receptor) pathway is indispensable for the

development, differentiation and maintenance of secondary lymphoid organs. To analyze the importance of the lymphoid organ structure for the induction of pathogen-specific immune responses and the pathogenesis of virus infections studies were performed by using $LT\alpha^{-/-}$ mice. It could be shown that in $LT\alpha^{-/-}$ mice the infection with sublethal doses of VSV leads to the induction of humoral immune responses similar to WT mice. Neither the ablation of $LT\alpha^{-/-}$ nor the disturbed lymphoid architecture impaired the induction of effective B cell responses and B/T cell interactions after VSV infections. Therefore no differences in the immune competence of WT and $LT\alpha^{-/-}$ mice were detectable after infections with VSV, which is a rather strong antigen. Therefore the question arose to which extent VSV-specific immune responses were affected in mice showing a disturbed lymphoid architecture using weaker antigens? To answer this question, mice were immunized with replication-deficient virus-like particles displaying the G protein of VSV (VLP-VSV). Unlike WT mice, in $LT\alpha^{-/-}$ or $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ mice no isotype switch to IgG was detectable. Thus, the expression of the $LT\alpha\beta$ transgene on T cell was not sufficient to induce the isotype-switch or to built up an immunological memory in $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ mice. Rather the micro architecture of lymphoid organs and other LT-dependent elements seems to be necessary to induce an IgG-response against VLP-VSV. In conclusion, neither the LT-pathway nor the exact architecture of lymphoid organs are necessary to induce an effective immune response against the strong antigen VSV. Despite disturbed lymphoid structures VSV can be recognized by several pattern recognition receptors. Presumably the parallel activation of these pathways compensates $LT\alpha$ -deficiency. In contrast VLP-VSV is replication deficient and lacks foreign nucleic acids. Thus VLP-VSV is not able to activate various different pathways and therefore only limited immunity is induced in $LT\alpha$ -deficient mice.

Lymphotoxin α ($LT\alpha$) and tumor necrosis factor α ($TNF\alpha$) are two members of the TNF/TNFR-superfamily which fulfil essential tasks in activation and regulation of the immune system in bacterial- or viral-infections. To analyze the role of $TNF\alpha$ and its adaptor protein TRADD in virus-infections, $TNF\alpha^{-/-}$ and $TRADD^{-/-}$ mice were infected with VSV. Due to the fact that the production of $IFN\alpha$ and the induction of neutralizing antibodies is not hampered, $TNF\alpha^{-/-}$ and $TRADD^{-/-}$ mice have the ability to control VSV infections. The results obtained in this study demonstrate a heavily impaired production of $IFN\beta$ in VSV infected TRADD deficient mice. Furthermore, the data of this study contribute to the finding that TRADD seems to be an important factor for the induction of $IFN\beta$ in the RIG-I antiviral pathway.

The induction of type I interferons is one essential and early response of innate immunity after virus-infections. To analyze the impact of type I IFN receptor-stimulation on myeloid cells a new transgenic mouse model (LysMcre-IFNAR^{fllox/fllox}) was used. In this mouse model the interferon-receptor (IFNAR) is deleted specifically in myeloid cells such as monocytes, macrophages and neutrophil granulocytes. The first results obtained in this work confirmed the functional deletion of the IFNAR in myeloid cells of LysMcre-IFNAR^{fllox/fllox} mice. Whereas low-titer infections with VSV were tolerated in LysMcre-IFNAR^{fllox/fllox} mice the importance of type I interferon on macrophages became apparent at higher infection doses independent of the infection route. LysMcre-IFNAR^{fllox/fllox} mount normal VSV antibody responses but show an VSV-sensitive phenotype which demonstrates the relevance of a functional interferon-system on myeloid cells to fend off virus infections. Tissue-specific macrophages seem to be a crucial element in the defence of VSV because the deletion of the IFNAR on macrophages leads to a reduced virus elimination and to an altered virus tropism. Although neutralizing antibodies were induced in LysMcre-IFNAR^{fllox/fllox} mice, VSV persisted longer in the organism. Hence the data point to an essential contribution of type I interferon triggering of macrophages in the elimination of peripheral VSV-infection and demonstrate the impact of local antiviral cells in the course of virus-infection.

The important role of type II interferon, i.e. IFN γ , in controlling intracellular pathogens and the development of effective adaptive immune responses is undoubtedly verified. However the cellular origin of IFN γ during different phases of an infection and the significance of these IFN γ responses for survival are only poorly defined. To analyze the role of different cell types producing IFN γ a new transgenic mouse model was generated where a cell type specific reconstitution of IFN γ expression is possible. Using this model the importance of conditionally expressed IFN γ in pathogenesis of virus-infections can be analyzed. Furthermore the new mouse model offers numerous options to study the impact of IFN γ in autoimmune disease such as EAE, which is a mouse model of multiple sclerosis. Within the framework of this work the targeting construct was stably integrated into the IFN γ locus of mouse embryonic stem cells by homologous recombination. Furthermore the deletion of the neomycin-resistance was performed by transient expression of Cre-recombinase which was initially verified in 5 subclones. One subclone was microinjected in C57Bl/6 blastocytes and several chimeric animals were born. By crossing chimeric mice and WT mice germline transmission was achieved and transgenic offspring was obtained.

Keywords: Immunology, transgenic mouse models, virus infections

3 Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	ABSTRACT	8
3	INHALTSVERZEICHNIS	11
4	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	14
4.1	Abbildungsverzeichnis.....	14
4.2	Tabellenverzeichnis	16
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	17
6	EINLEITUNG	23
6.1	Das Immunsystem.....	23
6.1.1	Immunglobuline.....	24
6.1.2	B Zell-Entwicklung.....	27
6.1.3	Immunologische Toleranz	29
6.2	Prionenerkrankungen	31
6.2.1	Das Prion-Protein	33
6.2.2	Die Konversionsreaktion.....	34
6.2.3	Periphere Prionen-Replikation und Neuroinvasion	35
6.2.4	Immuntherapien gegen Prionenkrankheiten.....	37
6.3	Die V _H KL25/V _H 6H4-Maus – Ein neues Mausmodell zur Untersuchung der immunologischen B Zell-Toleranz	39
6.4	Prionen, Zytokine und Virusinfektionen.....	41
6.4.1	Prionen und die Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe	41
6.4.2	Das TNF/LT Zytokinsystem	42
6.4.3	Interferone.....	47
6.5	Vesikuläres Stomatitis Virus.....	49
7	MATERIAL UND METHODEN	51
7.1	Geräte.....	51
7.2	Verbrauchsmittel und sonstige Materialien.....	53
7.3	Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer	55
7.4	Puffer und Lösungen.....	58
7.5	Medien und Medienzusätze	61
7.6	Antikörper.....	62
7.7	Enzyme	62
7.8	Kits.....	63
7.9	Oligonukleotide.....	64

7.10	Zelllinien.....	65
7.11	Mauslinien	65
7.12	Bakterien und Viren.....	66
7.13	Computerprogramme	66
7.14	Molekularbiologische Methoden	67
7.14.1	<i>Fällung von Nukleinsäuren</i>	<i>67</i>
7.14.2	<i>Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration</i>	<i>67</i>
7.14.3	<i>Präparation von DNA.....</i>	<i>68</i>
7.14.4	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	<i>69</i>
7.14.5	<i>Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden</i>	<i>69</i>
7.14.6	<i>DNA-Restriktion</i>	<i>69</i>
7.14.7	<i>Herstellung von blunt-ends.....</i>	<i>70</i>
7.14.8	<i>Dephosphorylierung von Nukleinsäuren</i>	<i>70</i>
7.14.9	<i>DNA-Ligation</i>	<i>71</i>
7.14.10	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>71</i>
7.14.11	<i>Radioaktiver Southern Blot</i>	<i>72</i>
7.15	Eukaryontische Zellkulturtechniken	73
7.15.1	<i>Arbeiten mit Zellkulturen.....</i>	<i>73</i>
7.15.2	<i>Passagieren von Zellen.....</i>	<i>73</i>
7.15.3	<i>Lagerung von Zellen.....</i>	<i>73</i>
7.15.4	<i>Zellzahlbestimmung.....</i>	<i>74</i>
7.16	Arbeiten mit murinen embryonalen Stammzellen.....	74
7.16.1	<i>Kulturbedingungen.....</i>	<i>74</i>
7.16.2	<i>Passagieren von ES-Zellen.....</i>	<i>74</i>
7.16.3	<i>Lagerung von ES Zellen</i>	<i>75</i>
7.16.4	<i>Präparation von primären embryonalen Fibroblasten (MEF).....</i>	<i>75</i>
7.16.5	<i>Irradiation von murinen embryonalen Fibroblasten</i>	<i>75</i>
7.16.6	<i>Elektroporation von ES Zellen</i>	<i>76</i>
7.16.7	<i>Transiente Expression von Cre-Rekombinase</i>	<i>76</i>
7.16.8	<i>Präparation von ES-Zellen zur Blastozysten-Injektion.....</i>	<i>77</i>
7.17	Mikrobiologische Techniken	78
7.17.1	<i>Kultivierung und Lagerung von Bakterien</i>	<i>78</i>
7.17.2	<i>Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....</i>	<i>78</i>
7.17.3	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	<i>78</i>
7.18	Tierexperimentelle Techniken	79
7.18.1	<i>Maushaltung.....</i>	<i>79</i>
7.18.2	<i>Mausnarkose</i>	<i>79</i>
7.18.3	<i>Maustötung.....</i>	<i>80</i>
7.18.4	<i>Retroorbitale Blutentnahme</i>	<i>80</i>
7.18.5	<i>Virusinfektion von Mäusen</i>	<i>80</i>
7.18.6	<i>Präparation von Peritonealzellen</i>	<i>80</i>
7.19	Immunologische und virologische Techniken	81

7.19.1	Anzucht von VSV	81
7.19.2	Bestimmung von Virustitern (Plaque-Assay).....	81
7.19.3	Bestimmung von VSV-neutralisierenden Antikörpertitern.....	81
7.19.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	82
7.19.5	Durchflusszytometrie.....	83
8	ERGEBNISSE	84
8.1	Entwicklung eines neuen Maus-Modells zur Analyse der PrP-spezifischen Immuntoleranz	84
8.1.1	Targeting-Strategie	84
8.1.2	Klonierungsstrategie des Targeting-Konstrukts.....	87
8.1.3	Targeting von murinen embryonalen Stammzellen	94
8.1.4	Screening nach homolog rekombinierten ES-Zell-Klonen	95
8.1.5	Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette	99
8.1.6	Generierung transgener Mäuse.....	102
8.2	Einfluss von Zytokinen auf die Abwehr von Virusinfektionen.....	105
8.2.1	Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe für die Induktion anti-viraler Antikörperantworten	105
8.2.2	Die Funktion von TRADD, einem neuen Faktor der TNF-Familie, bei der Virusabwehr.....	113
8.2.3	Der Einfluss von Typ I Interferon auf myeloiden Zellen bei der Eliminierung von Virusinfektionen	117
8.3	Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ	124
8.3.1	Targeting von murinen embryonalen Stammzellen	126
8.3.2	Screening und Identifikation von homolog rekombinierten Stammzellklonen.....	127
8.3.3	Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette	129
8.3.4	Generierung transgener Mäuse.....	131
9	DISKUSSION	133
9.1	Entwicklung eines neuen Maus-Modells zur Analyse der PrP-spezifischen Immuntoleranz	133
9.2	Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe für die Induktion anti-viraler Antikörperantworten	138
9.3	Die Funktion von TRADD, einem neuen Faktor der TNF-Familie, bei der Virusabwehr.....	144
9.4	Der Einfluss der Typ I Interferon-Rezeptor Stimulation auf myeloiden Zellen bei der Eliminierung von Virusinfektionen	147
9.5	Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ	151
10	ANHANG	154
11	QUELLEN- UND LITERATURVERZEICHNIS	156
12	LEBENS LAUF	178
13	KONFERENZBEITRÄGE	180
14	PUBLIKATIONEN	180

4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

4.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.....	25
Abb. 2 Organisation des genomischen Immunglobulin schwere Kette (IgH) Locus..	27
Abb. 3 Liganden und Rezeptoren des TNF/LT-Systems.....	42
Abb. 4 Signaltransduktion durch TNF-Rezeptor I.....	46
Abb. 5 Targeting Strategie für die Herstellung der V _H KL25-6H4-flox-Maus.....	86
Abb. 6 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Targeting-Vektors pV _H KL25-6H4-flox	87
Abb. 7 Klonierung von V _H KL25 in p <i>Bluescript</i> IIISK+.....	88
Abb. 8 Analytische Restriktion von pBS/V _H KL25/ClaI ⁻ -Vektorkonstrukten verschiedener bakterieller Klone mit <i>Cla</i> I.....	89
Abb. 9 DNA-Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide.....	90
Abb. 10 Hybridisierung von Oligonukleotiden zur Herstellung einer zusätzlichen loxP-site.....	90
Abb. 11 Analytische Restriktionen von fünf unabhängigen Klonen des Vektorkonstruktes pBS/V _H KL25/ClaI ⁻ /loxP zum Nachweis der Klonierung einer zusätzliche LoxP-site.....	91
Abb. 12 Klonierung von V _H 6H4 in pBS/V _H KL25/ClaI ⁻ /loxP.....	92
Abb. 13 Schematische Darstellung der <i>switch</i> -Kassette und des Targeting Konstrukts.....	92
Abb. 14 Klonierung der <i>switch</i> -Kassette in den Targeting-Vektor piV _H L2-neo ^r	93
Abb. 15 Linearisierung des Targeting-Vektors mit <i>Not</i> I.....	94
Abb. 16 Homolog rekombinierte ES Zell-Klonen wurden durch PCR identifiziert.....	95
Abb. 17 Funktionalität der <i>screening</i> -PCR.....	96
Abb. 18 Etablierung der <i>screening</i> -PCR.....	97
Abb. 19 Identifikation von positiven ES Zell-Klonen mittels PCR.....	97
Abb. 20 Schema des genomischen Southern Blots zum Nachweis der Integration des Targeting-Konstruktes in den genomischen Ig schwere Kette Locus.....	98
Abb. 21 A) Herstellung der HE-Sonde mittels PCR. B) Verifizierung von positiven ES Zell-Klonen mittels genomischem Southern Blot.....	99
Abb. 22 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette mittels PCR.....	100
Abb. 23 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette durch PCR	102
Abb. 24 Fotografien erzeugter chimäre Mäuse.....	104
Abb. 25 Genotypisierung der Versuchstiere	106

Abb. 26 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intranasaler Infektion der Versuchstiere mit VSV.....	107
Abb. 27 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intravenöser Infektion der Versuchstiere mit VSV.....	108
Abb. 28 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion.	109
Abb. 29 Neutralisierende Langzeit-Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion.	110
Abb. 30 Intravenöse Injektion von VLP-VSV erzeugt differenzierte B Zell-Antworten.	112
Abb. 31 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intravenöser Infektion der Versuchstiere mit VSV.....	114
Abb. 32 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach intravenöser VSV-Infektion	115
Abb. 33 Konzentration an IFN β im Serum, 24 Stunden nach intravenöser Infektion mit VSV	116
Abb. 34 Intranasale Infektion von IFNAR ^{-/-} Mäusen mit VSV.	117
Abb. 35 IFNAR-Expression auf Subtypen von peritonealen Makrophagen.....	118
Abb. 36 LysMcre-IFNAR ^{flax/flax} Mäuse sind sensitiver für mittlere und hohe Dosen intravenös injiziertem VSV.....	119
Abb. 37 LysMcre-IFNAR ^{flax/flax} Mäuse sind sensitiv für geringe Dosen intranasal injiziertem VSV	120
Abb. 38 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion	121
Abb. 39 Bestimmung der Viruslast verschiedener Organe nach Infektion mit VSV	123
Abb. 40 Schematische Darstellung der verwendeten TRAP-Kassette.....	125
Abb. 41 Targeting Strategie für die Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ	125
Abb. 42 Expression von Cre-Rekombinase vermittelt die konditionelle Expression von IFN γ	126
Abb. 43 Linearisierung des Targeting-Vektors mit <i>XhoI</i>	127
Abb. 44 Homolog rekombinierte ES-Zell-Klonen wurden durch PCR identifiziert.....	127
Abb. 45 Etablierung der <i>screening</i> -PCR.....	128
Abb. 46 Identifikation von positiven ES Zell-Klonen mittels PCR.....	129
Abb. 47 Etablierung der PCR zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette	130
Abb. 48 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette durch PCR	130

Abb. 49 (A) Nachweis der Keimbahntransmission durch PCR (B) Fotografie eines erzeugten transgenen Nachkommens.....	132
Abb. 50 Modell zur B und T Zell-Toleranz.	134
Abb. 51 Die Applikation schwacher Ag verdeutlicht die Bedeutung lymphatischer Mikroarchitektur.....	143
Abb. 52 TRADD als neue Komponente des RIG-I vermittelten antiviralen Signalpfades....	146

4.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien.....	32
Tabelle 2 Beschriebener Phänotyp von LT α -defizienten Mäusen	43
Tabelle 3 Verwendete Geräte.....	51
Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmittel und sonstige Materialien	53
Tabelle 5 Chemikalien, Lösungsmittel, Fertigpuffer	55
Tabelle 6 Puffer und Lösungen	58
Tabelle 7 Medien und Zusätze	61
Tabelle 8 Verwendete Antikörper	62
Tabelle 9 Verwendete Enzyme	62
Tabelle 10 Verwendete Kits.....	63
Tabelle 11 Oligonukleotide.....	64
Tabelle 12 Zelllinien	65
Tabelle 13 Mauslinien.....	65
Tabelle 14 Bakterien und Viren	66
Tabelle 15 Computerprogramme	66
Tabelle 16 Herstellung chimärer Mäuse..	103
Tabelle 17 Herstellung chimärer und vollständig transgener Mäuse.	132
Tabelle 18 Experimentelle Einsatzmöglichkeiten des neuen V _H KL25/V _H 6H4flox Mausmodells	136

5 Abkürzungsverzeichnis

α	Anti- / Alpha
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aq. dest.	<i>Aqua destillata</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BCR	B Zell-Rezeptor
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CGG	Hühnergammaglobulin
CIP	Alkalische Kälberdarm-Phosphatase
CJD	Creutzfeldt-Jakob Krankheit
cm ²	Quadratzentimeter
Cre	<i>Causes Recombination</i>
CTL	Cytotoxische CD8 ⁺ T Zelle
CWD	Chronische Verfallskrankheit
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle
dCTP	2'Desoxycytosin-5'-triphosphat

dpi	Tage nach Infektion/Injektion
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ES Zelle	Embryonale Stammzelle
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>Fluoresence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
flox	<i>Flanked by loxP sites</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HEPES	[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HSV	Herpes simplex Virus
<i>i.c.</i>	intracerebral
<i>i.n.</i>	intranasal
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös

IFN	Interferon
IFNAR	Typ I Interferonrezeptor
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVC	<i>Individually ventilated cage</i>
J	Joule
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β -Galactosidase Gen
Lck	Leukozyten-spezifische Protein TK Promoter
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
Lha	Langer homologer Arm
loxP	<i>locus of crossover (x) in P1</i>
LRS	lymphoretikuläres System
LT	Lymphotoxin
LysM	Muriner Lysozym M-Promoter
LZ	Lymphozyten
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
mg	Milligramm

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MZ	Marginalzone
ND	Nicht detektierbar
Neo	Neomycin-Resistenz
NF-κB	nukleärer Faktor-κB
ng	Nanogramm
NK Zellen	natürliche Killerzelle
N-Terminal	Amino-Terminal
OD	Optische Dichte
p. a.	für die Analyse
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Ionenprodukt des Wassers
pDC	plasmazytoide dentritische Zelle
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>Plaque Forming Unit</i>
PK	Proteinase K
pmol	Picomol
PP	Peyer's Plaques
PRNP	Prion-Protein Gen
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	Zelluläres Prion-Protein

PrP ^{Sc}	Pathogene Isoform des Prion-Protein
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Sha	Kurzer homologer Arm
SPF	Spezifisch pathogenfrei
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
tg	transgen
Th	T Helfer-Zelle
TI	T Zell-unabhängiges Antigen
TK	Tymidin-Kinase
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	Unter anderem
ü. N.	über Nacht

UV	ultraviolett
VLP	<i>Virus-like particle</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	VSV Glykoprotein
VSV-M	VSV-Matrixprotein
v/v	Volumen-Prozent
w/v	Gewichts-Prozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

6 Einleitung

6.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem entwickelte sich in vielzelligen Organismen, um eindringende Pathogene zu erkennen, zu eliminieren und somit den Organismus zu schützen. Dabei spielt die Differenzierung von fremden und gefährlichen Strukturen, sowie die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd eine entscheidende Rolle. Das angeborene Immunsystem dient als erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Bestimmte Zelltypen wie Makrophagen, Natürliche Killer Zellen (NK Zellen) und Granulozyten eliminieren Pathogene durch relativ unspezifische Mechanismen wie Phagozytose und die Zerstörung von infizierten Wirtszellen. Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren Rezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR), welche in der Lage sind konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) zu erkennen. Die PRRs umfassen verschiedene Rezeptorfamilien, wobei die am besten untersuchte Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) 12 verschiedene Rezeptoren beinhaltet, die u.a. mikrobielle oder virale DNA und RNA oder auch bakterielle Zellwandbestandteile erkennen können (Akira, S. und Takeda, K., 2004; Kawai, T. und Akira, S., 2006; Takeda, K. und Akira, S., 2003). Mit Hilfe des angeborenen Immunsystems ist ein Organismus in der Lage innerhalb kürzester Zeit auf bestimmte Pathogene zu reagieren und diese zu eliminieren. Jedoch ist das angeborene Immunsystem nicht in der Lage, einen Antigen-spezifischen Schutz zu generieren, diesen im Rahmen der Immunantwort weiter zu optimieren und einen lang-anhaltenden Schutz aufrecht zu erhalten. Dafür entwickelte sich in Vertebraten das adaptive Immunsystem, welches spezifisch und flexibel auf individuelle Pathogene reagieren kann (Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr., 2000). Wesentlicher Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind B und T Lymphozyten. Diese Zellen exprimieren Erkennungsrezeptoren (B und T Zell Rezeptor), die durch zufälliges somatisches Rearrangement von Gensegmenten entstehen und theoretisch alle vorstellbaren Antigene erkennen können. Aktivierte B Zellen können zu Plasmazellen differenzieren und sekretieren Antigen-spezifische Antikörper. Antikörper (Ak), auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, können Mikroorganismen oder Toxine neutralisieren um schädliche Effekte zu vermeiden oder opsonisieren Antigene, damit phagozytierende Zellen in der Lage sind diese zu eliminieren. Des Weiteren können Antikörper ein System von Plasmaproteinen, das

Komplementsystem, aktivieren. Die Auslösung des Komplements startet eine Kaskade von proteolytischen Spaltungen, aus denen die direkte Lyse des Mikroorganismus resultiert.

Der auf T Zellen exprimierte T Zell Rezeptor (TCR) dagegen, erkennt eine Kombination aus prozessiertem Antigen und speziellen Selbst-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). T Zellen werden in zwei Hauptgruppen, die $CD4^+$ T Helferzellen (Th) oder $CD8^+$ zytotoxischen T Zellen (CTL) eingeteilt. Th Zellen sind in der Lage die Immunantwort in eine CTL-vermittelte zelluläre oder durch Ak vermittelte humorale Richtung zu lenken. Weitere immunmodulatorische Funktionen werden von speziellen $CD4^+/CD25^+$ regulatorischen T Zellen (T_{reg}) übernommen (Kronenberg, M. und Rudensky, A., 2005).

Die Präsentation von Antigenen wird hauptsächlich von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gewährleistet. Hierbei spielen dendritische Zellen (DC), Makrophagen und auch B Zellen eine entscheidende Rolle. Diese Zellen endozytieren Antigene und präsentieren deren Oligopeptide auf MHC-Molekülen, welche die Aktivierung von T und B Zellen zur Folge haben. Das adaptive Immunsystem kann neben kurzlebigen, Antigen-spezifischen Effektorzellen eine besondere Fraktion differenzierter B und T Zellen generieren, die als langlebigen Gedächtniszellen im Organismus verbleiben und somit wiederkehrende Pathogene schneller und effizienter eliminieren.

6.1.1 Immunglobuline

Antikörper stellen die bedeutendste Komponente der humoralen Immunantwort dar und kommen im Blutplasma und in den extrazellulären Flüssigkeiten vor. Nach Aktivierung und Differenzierung zu Plasmazellen produzieren B-Zellen große Mengen an sezernierten Antikörpern. Jede B Zelle exprimiert im Rahmen ihrer Entwicklung einen unigen B Zell-Rezeptor, wobei im Mensch ca. 10^9 bis 10^{15} verschiedene B Zell-Rezeptoren vorkommen (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000a; Kamradt, T. und Mitchison, N. A., 2001). Burnet postulierte in der klonalen Selektionstheorie, dass die Lymphozytenspezifität bereits während der Entwicklung der Lymphozyten festgelegt wird (Burnet, F. M., 1976). Dabei ist das präimmune Antikörper-Repertoire so groß, dass theoretisch jedes mögliche Antigen gebunden werden kann. Kommt es zu einer Interaktion zwischen Antigenpräsentierender Zelle und einem entsprechenden B Zell-Rezeptor, wird die B Zelle zur Proliferation und Differenzierung aktiviert.

Zur Immunantwort tragen Antikörper auf unterschiedliche Weise bei. Durch direkte Bindung des Antikörpers an das Antigen oder Pathogen, kann dessen Wechselwirkung mit den Wirtszellen verhindert werden. Eine effiziente Eliminierung durch phagozytierende Zellen

erfolgt mittels Erkennung konstanter Fc-Anteile am Antikörper. Des Weiteren können Antikörper ein System von Plasmaproteinen, das Komplementsystem, aktivieren. Die Auslösung des Komplements startet eine Kaskade von proteolytischen Spaltungen, die in der direkten Lyse des Mikroorganismus resultiert (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000b).

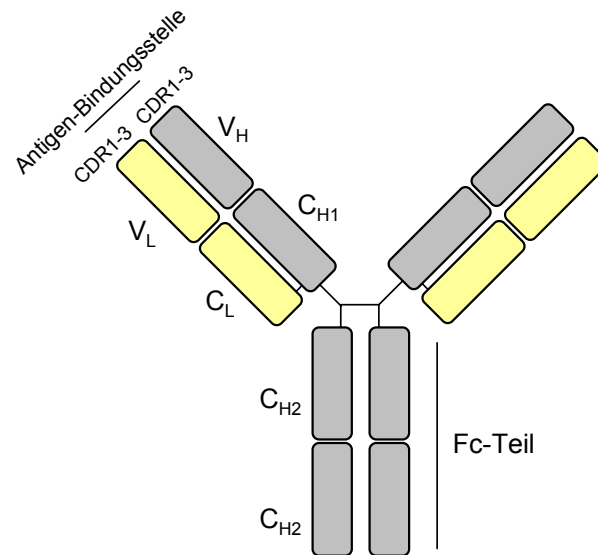


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls. Ein typischer Antikörper besteht aus zwei identischen schweren (grau) und zwei identischen leichten (gelb) Ketten, die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Während die variablen Regionen der leichten und schweren Kette (V_L und V_H) für die Bindung antigener Strukturen verantwortlich sind, wird die Induktion von Effektormechanismen über den Fc-Teil vermittelt (C_{H2} und C_{H3}).

Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren (H) und zwei identischen leichten (L) Ketten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abb. 1). Die konstanten Domänen am C-Terminus der schweren Kette, der sogenannte Fc-Teil, bestimmen dabei die Antikörperklasse. Die N-terminale Domäne jeder Kette besteht aus einer variablen (V) Region. Dieser variablen Bereiche enthalten jeweils drei hypervariable Regionen (CDR), die in Kombination die Antigenbindungsstelle bilden (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000a). Immunglobuline können, auf Grund verschiedener konstanter Anteile, in verschiedene Klassen aufgeteilt werden. Naive B Zellen exprimieren zunächst IgM und IgD, welche durch alternatives *splicing* entstehen. Nach Aktivierung können B Zellen durch weitere somatische DNA-Rekombinationen unterschiedliche C_H-Segmente exprimieren, ein Prozess der als Isotyp-Wechsel bezeichnet wird. Die fünf Hauptisotypen von Immunglobulinen sind IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Die verschiedenen konstanten Regionen erfüllen dabei

unterschiedliche Effektorfunktionen. So wird z. B. der Fc-Teil von IgG durch spezielle Fc-Rezeptoren erkannt, welche von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Diese Zellen sind in der Lage, von IgG umhüllte Pathogene zu erkennen und zu phagozytieren. Der Fc-Teil von IgE kann an den Fc ϵ -Rezeptor von Mastzellen und Basophilen Zellen binden und löst dadurch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus. Der Isotyp kann auch über die örtliche Verteilung von Immunglobulinen bestimmen. IgA wird durch aktiven Transport in mukosale Sekrete transferiert. Durch den Isotyp-Wechsel können somit Antikörper mit einer Vielzahl unterschiedlicher Effektorfunktionen entstehen, die in ihrer Antigen-spezifischen Wirkweise optimiert wurden.

Die außergewöhnliche Diversität des Antikörper-Repertoires wird durch eine einzigartige somatische Rekombination verschiedener Gensegmente erreicht. Für jeden Bereich des Antikörpers existieren eigene Gruppen von Gensegmenten, die auf unterschiedlichen Chromosomen codiert werden. Beim Menschen sind die leichten Ketten auf Chromosom 22 (κ -Kette) und auf Chromosom 2 (λ -Kette) verteilt; die H-Kette ist auf Chromosom 14 kodiert. Das IgH-Cluster besteht aus vier Arten von Gensegmenten: V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*) und C (*constant*). Die Ig-Loci der leichten Ketten enthalten keine D-Segmente. Der variable, Antigen-bindende Teil der Antikörper, wird von den V, (D) und J-Segmenten, welche in multiplen Kopien vorliegen, kodiert (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000a). In Abb. 2 ist der murine V_H-Lokus, dessen Länge auf 1,5 Megabasen geschätzt wird, dargestellt. In der Maus existieren jeweils ca. 150 V-Gensegmente der leichten und schweren Kette, wobei sich die V_H-Segmente, *upstream* des IgH-Lokus, auf Chromosom 12 befinden. Annähernd die Hälfte der V_H-Gene gehört zur J558-Familie. Ungefähr 98 kb *downstream* des letzten V_H-Elements liegen die 12 D-Segmente. Sie erstrecken sich über 60 kb und enden mit dem letzten D-Element DQ52. DQ52 ist von dem nächsten D-Element (DSp2.10) ~18 kb distanziert. Ungefähr 1 kb entfernt von DQ52 liegen vier J_H-Elemente. Danach folgen die Gensegmente, welche für die verschiedenen konstanten Regionen eines Antikörpers kodieren.

Während der Lymphozyten-Entwicklung werden je ein V, (ein D) und ein J-Element zufällig rekombiniert. Diese somatische, sequenzspezifische Rekombination wird von einem V(D)J-Rekombinase Enzymkomplex katalysiert und besteht u. a. aus den Proteinen RAG1 und RAG2 (Schatz, D. G., 2004; Brandt, V. L. und Roth, D. B., 2004). Eine zusätzliche Variabilität entsteht durch das Einfügen von P-Nukleotiden. Weiterhin führt eine ungenaue Rekombination zum Verlust oder Hinzufügen zufälliger N-Nukleotide mittels der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) (Chatterji, M. *et al.*, 2004). Diese verknüpfungsbedingten Variationen wirken sich direkt auf die Qualität der Antigen-

Bindungsstelle aus, da sie vor allem die dritte hypervariable Region (CDR3) der V-Region betreffen. Die zufällige Kombination der V(D)J-Elemente, der schweren und leichten Ketten, sowie das Einfügen von P- und N-Nukleotiden führen zu einer hohen Anzahl an Antikörperspezifitäten, welche sowohl schützende als auch potentiell autoreaktive Ig enthalten können (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000b).

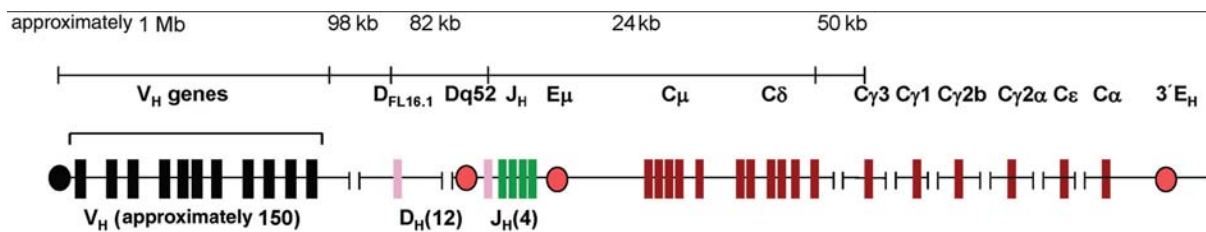


Abb. 2 Organisation des genomischen Immunglobulin schwere Kette (IgH) Lokus. Schematische Darstellung des murinen IgH-Lokus, der ca. 150 V_H -Gene, 12 D_H -Gensegment und 4 J_H -Gene enthält. Des Weiteren sind die möglichen, exprimierten konstanten Regionen C_μ bis C_α und drei cis-regulatorische Elemente (rote Ovale) dargestellt: E_μ - Intron-Enhancer, DQ52-Promotor, $3'E_H$ - 3'-Enhancer (nach Chowdhury, D. und Sen, R., 2004).

6.1.2 B Zell-Entwicklung

B Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche zunächst zu lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) differenzieren, aus welchen B, T und NK Zellen entstehen können. In Maus-Embryonen findet die Immunzellentwicklung zunächst in der fötalen Leber statt, während die B Zell-Entwicklung postnatal auf das Knochenmark beschränkt ist (Hardy, R. R. und Hayakawa, K., 2001).

Das Ig-Rearrangement der schweren Kette beginnt in frühen Pro-B Zellen mit der zufälligen Verknüpfung von einem D- und einem J_H -Element (*joining*). In späten Pro-B Zellen erfolgt die Rekombination eines V_H -Elements mit dem zuvor rearrangierten DJ_H -Segment. Dieses VDJ-*Joining* wird zunächst auf nur einem Allel durchgeführt. Kommt ein funktionelles Rearrangement zustande, wird die Rekombination auf dem anderen Allel unterdrückt; ein Vorgang der als allelische Exklusion bezeichnet wird (Burnet, F. M., 1976; Schlissel, M., 2002). Ist die Umlagerung auf dem ersten Allel unfunktional, wird das Rearrangement auf dem zweiten Allel durchgeführt. Ein erfolgreiches VDJ-*Joining* führt im Prä-B Zell-Stadium zur Expression der H-Kette mit der konstanten Region eines IgM-Moleküls (μ -Kette). In Prä-B Zellen wird die μ -Kette zusammen mit einer Ersatz-L-Kette intrazellulär exprimiert, was

zur Herunterregulierung der Expression der Rekombinations-Enzyme (RAG1, RAG2, TdT) und zur Proliferation der B Zellen führt.

Die RAG1/2 Rekombinasen werden anschließend erneut exprimiert, um das Rearrangement der Leichten-Kette im genomischen L-Lokus zu beginnen. In der Regel beginnt die Rekombination am κ -Lokus, wobei ein V_L - mit einem J_L -Element verbunden wird. Kommt es auf beiden Allelen des κ -Lokus zu einer nicht-produktiven Rekombination, beginnt das Rearrangement auf einem λ -Lokus. Die funktionale L-Kette interagiert mit der μ -Kette und wird als BCR auf der Oberfläche von unreifen B-Zellen exprimiert.

Anschließend wandern die unreifen B Zellen in die Peripherie. Dabei konkurrieren die peripheren B Zellen um den Zugang zu den Follikeln in den peripheren lymphatischen Geweben. Die Follikel liefern naiven B Zellen essenzielle Signale für das Überleben und die weitere Reifung. Es gelangen jedoch nur wenige B Zellen in den relativ langlebigen, peripheren B Zell-Pool, während die meisten Zellen innerhalb von wenigen Tagen eliminiert werden. Auf reifen, naiven B Zellen werden IgM und IgD co-exprimiert. Die Transkription der C_μ Region läuft dabei über das benachbarte δ Exon weiter und führt zu einem langen Primärtranskript, welches alternativ gespleisst werden kann.

Naive B Zellen zirkulieren zunächst durch die peripheren lymphatischen Gewebe. Aktiviert werden B Zellen, deren BCR durch ein spezifisches Antigen quervernetzt wird und durch Co-Stimulation durch antigenspezifische T Zellen. Ein Teil der proliferierenden B Zellen differenziert zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, während ein anderer Teil in primäre Lymphfollikel wandert und Keimzentren bildet. Im Keimzentrum durchlaufen die B Zellen wichtige Modifikationen. Durch somatische Hypermutationen können die variablen Regionen der Ig verändert werden. Die Anhäufung von Mutationen führt zu einer Affinitätsreifung, bei der B Zellen mit hoher Spezifität und Affinität für das Antigen selektioniert werden. Des Weiteren führen B Zellen einen Isotypwechsel durch um bestimmte Effektorfunktionen der Antikörper zu induzieren. Darüber hinaus sind B Zellen in der Lage zu langlebigen B Gedächtniszellen zu differenzieren und stellen somit einen Teil des immunologischen Gedächtnis dar (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000b).

6.1.3 Immunologische Toleranz

Das Immunsystem ist ein schlagkräftiges Instrument zur Bekämpfung von Infektionen, indem es Pathogene eliminieren und infizierte Zellen abtöten kann. Diese Aufgaben werden unter anderem von Lymphozyten übernommen, die ein zufälliges, hochvariables Rezeptor-Repertoire generieren können. Dabei entstehen jedoch auch Lymphozyten, die körpereigene Strukturen erkennen, potentielle Autoreaktivität besitzen und dem Organismus somit schaden könnten. Auf 20 bis 50 % wird der Prozentsatz an B und T Zell-Rezeptoren geschätzt, die mit hoher Affinität Selbst-Antigene erkennen und so eine Gefahr für den Organismus darstellen (Wardemann, H. *et al.*, 2003; Laufer, T. M. *et al.*, 1996), wobei nur etwa 3-8% der Bevölkerung (USA) eine Autoimmunerkrankung entwickeln (Jacobson, D. L. *et al.*, 1997). Zur Kontrolle dieser Selbst-reaktiven Rezeptoren in B und T Zellen bestehen im Immunsystem verschiedene Mechanismen, welche zur sogenannten immunologischen Toleranz dieser Zellen führen. B Zellen werden zunächst durch negative Selektion im Knochenmark auf ihre immunologische Toleranz bezüglich Selbst-Antigene überprüft. Jedoch muss es auch Mechanismen geben die B Zellen selektionieren, die körpereigene Moleküle erkennen, welche nur in bestimmten Geweben in der Peripherie exprimiert werden. Zum Einen besteht die Möglichkeit, B Zellen, die einen potentiellen autoreaktiven Rezeptor exprimieren, durch Induktion der Apoptose zu eliminieren. Sobald eine B Zelle im Knochenmark einen potentiell selbstreaktiven BCR exprimiert, hängt ihr weiteres Schicksal von den Eigenschaften des Liganden ab, an den der BCR binden kann. Eine autoreaktive B Zelle, die ein multivalentes, körpereigenes Antigen erkennt, stirbt in der Regel im Knochenmark durch Apoptose; sie wird klonal deletiert (Halverson, R. *et al.*, 2004). Aktivierte B Zellen, die bei der Proliferation und somatischen Hypermutation in den Keimzentren peripherer Lymphgewebe Autoreaktivitäten entwickeln sterben ebenfalls durch Apoptose. Diese Deletion kann in weniger als 4 Stunden induziert werden, wenn der BCR im Keimzentrum an ein Antigen bindet, das nicht von T-Zellen erkannt wird (Goodnow, C. C. *et al.*, 2005).

Oftmals haben B und T Zellen jedoch die Möglichkeit dem programmierten Zelltod zu entgehen, indem sie weitere V(D)J-Rearrangements durchführen oder ihre Antigenbindungsstelle durch somatische Mutationen (Rezeptor-Editing) verändern, so dass ein nicht selbstreaktiver Rezeptor exprimiert werden kann (Nemazee, D. und Hogquist, K. A.,

2003). Es wird postuliert, dass auch die Intensität des Antigensignals das Schicksal der B Zellen bestimmt, indem ein schwaches Signal erneute Gen-Umlagerungen fördert, wohingegen ein starkes Antigen-Signal direkt in die Apoptose führt (Melamed, D. *et al.*, 1998).

Zusätzlich können potentiell selbstreaktive Rezeptoren durch intrinsische, biochemische Veränderungen in B Zellen reguliert werden. Binden z.B. unreife B Zellen an lösliche Autoantigene, die den B Zell-Rezeptor quervernetzen, führen verschiedene zelluläre Mechanismen zu einem Zustand der als Anergie bezeichnet wird. Diese inaktivierten B Lymphozyten exprimieren den BCR nur noch in geringen Mengen und können durch Antigen-spezifischen T Zellen nicht mehr aktiviert werden. Anergische B Zellen werden von den Lymphfollikeln ausgeschlossen, indem sie in der T Zell-Zone festgehalten werden. Autoreaktive B Zellen können dabei nicht mit CD4⁺ T Helferzellen in Wechselwirkung treten (Adelstein, S. *et al.*, 1991). Die fehlende Wechselwirkung und der Entzug von weiteren Überlebenssignale führt schließlich zum Absterben der B Zelle (Healy, J. I. und Goodnow, C. C., 1998).

Schließlich können extrinsische Signale, wie die Vermeidung von Co-stimulierenden Signalen oder aktive Suppression durch regulatorische Zellen zur Vermeidung von aktiven, autoaggressiven Zellen führen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung sogenannter T Suppressorzellen oder T Regulatorzellen, die für körpereigene Antigene spezifisch sind, zu einem kontaktabhängigen Abtöten autoreaktiver Zellen führen kann (Kronenberg, M. und Rudensky, A., 2005).

Trotz der vielfältigen Kontrollmechanismen kann es zum Bruch der Toleranz gegen ein spezifisches Selbstantigen und damit zu Autoimmunreaktionen kommen. Diese Mechanismen sind bisher kaum verstanden. Es scheinen aber verschiedene Parameter, wie genetische Anfälligkeit, Umweltfaktoren, Defekte in der Signaltransduktion oder Gewebeschäden eine Rolle zu spielen. Obwohl BCR und TCR spezifisch sein sollten, können Kreuz-Reaktionen durch molekulare Mimikry entstehen. Hierbei führen z.B. mikrobielle Epitope zu einer Produktion von Antikörpern und Aktivierung von T Zellen, die auch gegen Selbstantigene gerichtet sein können (Delves, P. J. und Roitt, I. M., 2000b). Des Weiteren können Signale von T Helfer-Zellen eine Aktivierung anergischer B Zellen bewirken und somit Autoimmunreaktionen hervorrufen (Goodnow, C. C. *et al.*, 2005).

6.2 Prionenerkrankungen

Die Gruppe der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSEs) oder Prionenerkrankungen zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen, die den Mensch und verschiedene Tierarten betreffen. Sie sind durch eine langsame, degenerative Gehirnzerstörung gekennzeichnet, die zu Verhaltensänderungen, Bewegungsstörungen und zu Demenz führen. Als pathologische Manifestationen lassen sich im Gehirn ein Verlust an Neuronen, eine Astrozytenvermehrung (Astrozytose), charakteristische schwammartige (spongiforme) Läsionen, Mikroglia-Aktivierung und Gliosis, sowie Ablagerungen von amyloiden Strukturen feststellen (Budka, H. *et al.*, 1995). Des Weiteren zeichnen sich Prionenkrankheiten durch Inkubationszeiten von mehreren Jahren bis Jahrzehnten aus und verlaufen immer letal. Prionenerkrankungen teilen wichtige mechanistische Aspekte mit anderen neurodegenerativen Krankheiten, wie der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit, sind aber einzigartig in ihrer horizontalen und vertikalen Übertragbarkeit.

Die bovine spongiforme Enzephalopathie in Rindern (Wells, G. A. *et al.*, 1987), Scrapie in Schafen und Ziegen (McGowan, J. P. 1922) und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit des Menschen (Creutzfeldt, H. G., 1989) repräsentieren die wichtigsten TSE-Formen (Tabelle 1). Das Auftreten einer neuartigen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) bei jungen Menschen in Großbritannien, führte zu einem stärkeren Interesse der Öffentlichkeit an diesen Krankheiten (Will, R. G. *et al.*, 1996). Experimentelle Untersuchungen weisen auf viele Gemeinsamkeiten des BSE-erzeugenden Erregers und dem vCJD-Erreger hin. Diese Befunde legen nahe, dass der Verzehr von BSE-kontaminiertem Rindfleisch eine ursächliche Rolle beim dem Auftreten der vCJD spielt (Collinge, J., 1997).

Lange Zeit bestand der Verdacht, dass der TSE-Erreger ein Virus oder ein Viroid sein könnte (Sigurdsson B. 1954; Thormar, H., 1971). Jedoch führte die ungewöhnliche Resistenz des Erregers gegen Nukleinsäure-inaktivierende Reagenzien und der inaktivierende Einfluss Protein-abbauender bzw. Proteinstruktur-auflösender Substanzen zu der Annahme, dass das infektiöse Agens frei von jeglicher Nukleinsäure sei (Alper, T. *et al.*, 1967). Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Erreger ein Protein sein könnte (Griffith, J. S., 1967). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Krankheiten durch ein, aus Hirngewebe isolierbarem, Agens hervorgerufen wurden, welches als „Prion“ (*proteinaceous infectious particle*) bezeichnet wurde (Prusiner, S. B., 1982). Stanley Prusiner stellte eine „protein only“-Hypothese auf, in welcher das infektiöse TSE-Agens nur aus dem Prion-Protein PrP^{Sc} besteht.

Das infektiöse Protein ist dabei eine posttranslational modifizierte Form des zellulären Prion-Protein (PrP^C) und kann dieses, durch Veränderung der räumlichen Struktur, in weitere PrP^{Sc} umwandeln. Das zelluläre PrP^C und seine pathogene Isoform PrP^{Sc} werden von demselben Gen *PRNP* kodiert, wie wenig später in der Gruppe von Charles Weissmann gezeigt werden konnte (Oesch, B. *et al.*, 1985; Basler, K. *et al.*, 1986). Trotz der Existenz weiterer Modelle zur Natur des Erregers (Virus-Hypothese, Virino-Hypothese) ist die „protein-only“-Hypothese in Fachkreisen die am meisten akzeptierte.

Tabelle 1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (verändert nach Mabbott, N. A. und MacPherson, G. G., 2006)

TSE Krankheit	Betroffene Spezies	Übertragungsroute
Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit (vCJD)	Mensch	Aufnahme von BSE-kontaminierten Nahrungsmitteln
Sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit (sCJD)	Mensch	Vermutlich somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc}
Iatrogene Creutzfeldt-Jakob Krankheit (iCJD)	Mensch	Durch ärztliche Maßnahmen verursachte Übertragung
Familiäre Creutzfeldt-Jakob Krankheit (fCJD)	Mensch	Mutationen im <i>PRNP</i> -Gen
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	Mensch	Mutationen im <i>PRNP</i> -Gen
Fatale familiäre Insomnie	Mensch	Mutationen im <i>PRNP</i> -Gen
Kuru	Mensch	Ritualistischer Kannibalismus
Scrapie	Schaf, Ziege, Mufflon	Erworben, horizontale Übertragung
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Aufnahme von BSE-kontaminiertem Futter
Chronische Verfallskrankheit (CWD)	Verschiedene Hirsch- und Elch-Arten	Erworben, horizontale Übertragung
Feline spongiforme Enzephalopathie	Haus- und Wildkatzen	Aufnahme von BSE-kontaminiertem Futter

übertragbare Enzephalopathie der Nerze	Nerze	Erworben, Quelle unbekannt
spongiforme Enzephalopathie der Zooungulaten	Verschiedene Antilopenarten	Aufnahme von BSE-kontaminiertem Futter

6.2.1 Das Prion-Protein

Die zelluläre Form des Prion-Proteins PrP^C wird in vielen Geweben von Säugetieren exprimiert (Caughey, B. und Baron, G. S., 2006). Besonders im zentralen Nervensystem und in bestimmten Zellen des Immunsystems lassen sich hohe Expressions-Level nachweisen (Ford, M. J. *et al.*, 2002). Die physiologische Rolle von PrP^C ist trotz intensiver Bemühungen weitgehend unklar. PrP-*knockout*-Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp, außer einem veränderten Circadianrythmus, sind aber vollständig resistent gegenüber einer Prionen-Infektion (Bueler, H. *et al.*, 1993, Bueler, H. *et al.*, 1992). PrP^C ist mithilfe eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Restes (GPI) an der äußeren Zellmembran verankert. Durch die Phosphatidyl-Inositol spezifische Phospholipase C (PIPLC) kann es von der Zellmembran freigesetzt werden (Weissmann, C., 2004). Wie die meisten GPI-Proteine scheint PrP^C in Sphingolipid-Cholesterol-Kompartimenten, die auch als *Lipid-Rafts* bezeichnet werden, organisiert zu sein (Naslavsky, N. *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass PrP^C eine Rolle in zellulären Signal-Transduktionswegen spielen könnte. Es liegen Hinweise vor, dass PrP^C über seine Oktapeptid-Sequenz Kupfer binden kann, um eine Superoxid-Dismutase-Funktion zu erfüllen (Kretzschmar, H. A. *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass PrP^C Einfluss auf die Erneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (Zhang, C. C. *et al.*, 2006), sowie die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen hat (Steele, A. D. *et al.*, 2006). PrP^C scheint ebenfalls relevante Funktionen während der Phase einer Inflammation auszuüben, da es die Phagozytose von Makrophagen und die Rekrutierung von Leukozyten modulieren kann (de Almeida, C. J. *et al.*, 2005).

Die zelluläre Form des Prion-Proteins PrP^C und die infektiöse Isoform PrP^{Sc} weisen bei identischer Aminosäuresequenz, unterschiedliche biochemische und biophysikalische Eigenschaften auf. PrP^C existiert in einer di-, mono- und unglykosylierten Form, ist wasserlöslich und durch Proteinase K (PK) vollständig abbaubar. PrP^{Sc} hingegen ist in Detergenzien unlöslich, extrem widerstandsfähig gegenüber proteolytischem Abbau, Hitze und herkömmlichen Desinfektionsmitteln. Ein milder Proteinase K-Verdau von PrP^{Sc} führt zum Verlust der N-terminalen Aminosäuren 87-91. Die exakte Position hängt dabei vom

jeweiligen Prionen-Stamm ab. Dies führt zu einem charakteristischen Mobilitäts-*Shift*, der in einem SDS-PAGE zum Auftreten von drei Banden führt, die die unterschiedlichen Glykosylierungsformen widerspiegeln und ein Molekulargewicht von 27-30 kDa aufweisen. Der nach PK-Verdau verbleibende infektiöse Rest des Prion-Proteins wird deshalb auch als PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet. Durch mehrere PrP²⁷⁻³⁰ Moleküle können regelmäßige amyloide Strukturen, die in SAF-Aggregaten (Scrapie-assoziierte Fibrillen) oder Prion-Rods organisiert sind, gebildet werden. Dieser „geschützte Verband“ widersteht einem weiteren Abbau durch PK. PrP^{Sc} stellt die Hauptkomponente der extrazellulären Ablagerungen in Form von dichten amyloiden Plaques dar und reichert sich außerdem in der Zelle, vor allem in Lysosomen an. Des Weiteren kann PrP^{Sc} nicht durch PIPLC von der Zellmembran freigesetzt werden. Die unterschiedlichen Eigenschaften werden vermutlich durch die verschiedenen Sekundär- und Tertiärstrukturen von PrP^C und PrP^{Sc} hervorgerufen. Mithilfe von NMR-Analysen wurde es 1996 erstmals möglich, die dreidimensionale Struktur eines rekombinanten C-terminalen PrP^C (121-231) zu bestimmen. Dieses Fragment bildet eine globuläre Domäne, die drei α -Helices und eine zweisträngige β -Faltblattstruktur aufweist (Zahn, R. *et al.*, 2000). Wenig später konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil von PrP^C hoch flexibel ist und keine definierte dreidimensionale Struktur aufweist. Aufgrund der Unlöslichkeit und der starken Tendenz zur Aggregation entzog sich PrP^{Sc} einer Strukturanalyse durch NMR-Untersuchungen. Unter denaturierenden Bedingungen und mithilfe von Infrarotspektroskopie (Pan, K. M. *et al.*, 1993) bzw. Circular dichroismus-Spektroskopie (Safar, J. *et al.*, 1993) konnte jedoch die zweidimensionale Struktur von PrP^C und PrP^{Sc} untersucht werden. So wurde gezeigt, dass PrP^C einen hohen Anteil an α -Helices besitzt (~42%), jedoch nur ca. 3% β -Faltblatt-Strukturen. Dagegen weist PrP^{Sc} mit ca. 43 % eine hohe Menge an β -Faltblattstrukturen und einen verminderten Anteil an α -Helices (~30%) auf (Pan, K. M. *et al.*, 1993).

6.2.2 Die Konversionsreaktion

Die „*protein-only*“-Hypothese postuliert, dass Prionen eine Isoform des zellulären PrP^C darstellen und dass die Replikation durch eine selbst-induzierte Konversion von PrP^C in die pathogene Isoform PrP^{Sc} erfolgt. Zwei populäre Modelle versuchen die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} zu beschreiben:

Nach dem Umfaltungsmodell ist die Konformationsänderung von PrP^C in PrP^{Sc} kinetisch kontrolliert. Eine hohe Aktivierungsenergie verhindert eine spontane Umwandlung von PrP^C in nachweisbare Mengen von PrP^{Sc}. Die Interaktion von infektiösem PrP^{Sc} mit PrP^C oder

einem teilweise entfalteten Intermediats, induziert dessen Konformationsänderung in weitere Moleküle PrP^{Sc}. Diese Konversationsreaktion kann mithilfe eines Enzyms oder eines Chaperons beschleunigt werden. Mit diesem Modell kann das Auftreten sporadischer und erblich bedingter TSEs erklärt werden. Durch bestimmte Mutationen im *PRNP*-Gen könnte die spontane Konversion in PrP^{Sc} begünstigt werden und somit spontan auftreten.

Die Keim-induzierte Konversion oder das *Seeding*-Modell postuliert ein Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc}, wobei dieses Gleichgewicht stark in Richtung der PrP^C Konformation verschoben ist. PrP^{Sc} kann lediglich durch Anlagerung an einen kristallinen Keim eines PrP^{Sc}-Aggregats stabilisiert werden. Die Keimbildung verläuft dabei sehr langsam ab. Nach der Keimbildung erfolgt die Anlagerung von PrP^{Sc} Monomeren beschleunigt. Damit das exponentielle Wachstum von PrP^{Sc} während einer Infektion erklärt werden kann, muss es zu einer gelegentlichen Separation der Aggregate kommen (Weissmann, C., 2004; Aguzzi, A. und Sigurdson, C. J., 2004).

6.2.3 Periphere Prionen-Replikation und Neuroinvasion

Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Infektion mit Prionen meistens auf oralem Weg. Die Prionen verbreiten sich anschließend von der Peripherie in das zentrale Nervensystem (ZNS). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass M (*microfold*) Zellen, spezialisierte Darmepithelzellen, den Übertritt des Agens aus dem Darmlumen in das umliegende Gewebe ermöglichen (Heppner, F. L. *et al.*, 2001a). Anschließend erfolgt eine periphere Replikation der Prionen im lymphoretikulären System. Die Art des lymphatischen Gewebes hängt dabei offensichtlich von Wirt, Prionenstamm und Infektionsweg ab. Der Transfer vom Darmepithel bis zum lymphatischen Gewebe ist noch weitgehend ungeklärt. Man nimmt an, dass dendritische Zellen (DC) (Aucouturier, P. *et al.*, 2001; Huang, F. P. *et al.*, 2002) und Makrophagen (Prinz, M. *et al.*, 2002) den Transport von Prionen vermitteln können.

Die Expression von PrP^C ist für die Prionen-Replikation und für den Transport des infektiösen Agens von der Peripherie ins ZNS erforderlich (Blattler, T. *et al.*, 1997; Brandner, S. *et al.*, 1996). Die Rekonstitution von *Prnp*^{0/0} Mäusen mit Knochenmark von Wildtyp-Tieren ist nicht ausreichend, um eine Neuroinvasion wiederherzustellen, obwohl die Fähigkeit der Milz, Prionen zu akkumulieren, wiederhergestellt werden konnte (Blattler, T. *et al.*, 1997). Das zeigt, dass die PrP^C-Expression in weiteren Geweben, vornehmlich dem peripheren Nervensystem, benötigt wird.

B Zellen, die nicht notwendigerweise PrP^C exprimieren müssen, spielen eine entscheidende Rolle für die periphere Prionenverbreitung und Neuroinvasion (Klein, M. A. *et al.*, 1997), da sie Reifungssignale für follikuläre dendritische Zellen (FDC) bereitstellen. FDCs sind mitotisch-inaktive Zellen, die sich in den B Zell-Follikeln lymphatischer Gewebe aufhalten und auf der Oberfläche ihrer Fortsätze Immunkomplexe binden. Damit dienen sie als Langzeitlagerstätte für nicht prozessierte Antigene und sind in der Lage PrP^{Sc} zu akkumulieren. Für ihre Reifung benötigen sie B Zell-Signale, die über Lymphotoxin α/β (LT α/β) vermittelt werden (Mackay, F. und Browning, J. L., 1998). Die Blockade des LT β -Signalpfads durch Zugabe löslicher LT β -Rezeptor-Ig führt zur Eliminierung von FDCs und zu einer stark verringerten Neuroinvasion, Akkumulation von peripheren PrP^{Sc} und Infektiösität (Mabbott, N. A. *et al.*, 2000; Montrasio, F. *et al.*, 2000), bis hin zu einem vollständigen Schutz gegenüber einer Prioneninfektion (Aguzzi, A. und Heikenwalder, M., 2005). Funktionelle FDCs spielen demnach für die Replikation von Prionen und somit für die Pathogenese eine entscheidende Rolle, wobei auch weitere Zell-Typen des Lymphoretikularsystems für die Replikation oder Akkumulation von Prionen von Bedeutung erscheinen (Prinz, M. *et al.*, 2002).

Der Prionen-Transfer zwischen Immun- und Nervensystem scheint einer der wichtigsten Faktoren zu sein, welche die Effizienz und die Geschwindigkeit der Neuroinvasion bestimmen. Da Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke in der Regel nicht passieren können vermutet man, dass Prionen entlang von sympathischen Nervenfasern, welche in den Lymphknoten in engem Kontakt mit FDCs stehen, ins Gehirn gelangen. Permanente oder transiente Sympathektomie führte im Mausmodell zu einer verlängerten Inkubationszeit nach intra peritonealer (*i.p.*) Injektion von Prionen. Im Gegensatz dazu zeigen transgene Mäuse, die den Nervenwachstumsfaktor NGF überexprimieren und dadurch eine sympathische Hyperinnervation der lymphoiden Organe aufweisen, eine verkürzte Inkubationszeit und einen 100-fach erhöhten Infektionstiter in der Milz, (Glatzel, M. *et al.*, 2001). Ob die erhöhte Neuroinvasion aus der passiven Diffusion der Prionen von FDCs auf die peripheren Nerven resultiert oder ob mobile Zellen involviert sind, ist bis heute unklar. Des Weiteren scheinen Prionenerkrankungen zu einer atypischen Inflammation des ZNS zu führen. Die Expression von proinflammatorischen- und Effektor-Zytokinen ist erhöht, T Zellen können teilweise ins ZNS einwandern (Betmouni, S. *et al.*, 1996) und es kommt zur Aktivierung und Proliferation von Mikrogliazellen (Heppner, F. L. *et al.*, 2001c). Die intra craniale (*i.c.*) Prionen-Applikation in verschiedenen Modellen immundefizienter Mäuse, führte zu einer gewöhnlichen Pathogenese mit Kinetiken und intracerebralen Prionenkonzentrationen, die

auch immunkompetente Mäuse aufwiesen (Aguzzi, A. und Sigurdson, C. J., 2004). Diese Untersuchungen implizieren, dass nach Infiltration des ZNS durch Prionen, der Krankheitsverlauf durch immunologische Parameter nicht mehr beeinflusst wird.

6.2.4 Immuntherapien gegen Prionenkrankheiten

Neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer, BSE und CJD belasten durch Kosten und ihre momentane Unheilbarkeit die Gesellschaft. Zurzeit sind weder prophylaktische noch therapeutische Maßnahmen verfügbar. Immuntherapeutische Strategien gegen Prionenkrankheiten beruhen zumeist auf dem Prinzip, dass passiv applizierte Antikörper PrP^{Sc} in der Peripherie binden und somit die Invasion in das ZNS verhindern sollen. Die Induktion einer aktiven humoralen Immunantwort gegen PrP^{Sc} gestaltet sich jedoch, auf Grund der immunologischen Toleranz gegenüber dem endogenen, auf vielen Zellen exprimierten PrP^C, schwierig. Da das Immunsystem normalerweise keine Selbst-Determinanten attackiert, ist es nicht überraschend dass keine PrP^{Sc}-spezifische Immunantwort induziert wird, da hier die Gefahr für ungewollte Autoimmunreaktionen bestünde. Im Moment existiert kein Antikörper, der zuverlässig zwischen PrP^C und PrP^{Sc} differenzieren kann, so dass eine denkbare Immuntherapie gegen PrP^{Sc}, auch immer gegen PrP^C gerichtet sein wird.

Dennoch erscheint die Möglichkeit immuntherapeutisch gegen Prionen-Krankheiten vorzugehen durchaus vielversprechend. Bereits 1988 wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, bei denen der Prionen-Titer infektiöser Hamstergehirn-Homogenate durch anti-PrP Antiseren reduziert werden konnte (Gabizon, R. *et al.*, 1988). Später wurde im zellfreien System gezeigt dass die Anwesenheit eines anti-PrP Antikörpers die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} verhindern vermag (Horiuchi, M. und Caughey, B., 1999). Mit Hilfe von PrP-spezifischen Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten, konnte eine *de novo* Scrapie-Infektion verhindert und PrP^{Sc} aus chronisch Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen eliminiert werden (Enari, M. *et al.*, 2001; Peretz, D. *et al.*, 2001). Im Jahre 2003 gelang White und Kollegen die erste passive Immunisierung. Die *i.p.* Applikation eines PrP-spezifischen, monoklonalen Antikörpers erfolgte direkt nach Beginn der peripheren Prionen-Replikation oder während der Plateauphase der PrP^{Sc}-Akkumulation. In beiden Fällen führte eine Antikörperbehandlung zu einer deutlichen Reduktion des PrP^{Sc}-Titers in der Milz und die Überlebenszeit konnte um ca. 150% auf mehr als 500 Tage verlängert werden. Der passive Transfer der anti-PrP Antikörper hatte dagegen keinen Effekt, wenn er erst nach dem Auftreten klinischer Symptome erfolgte. In *i.c.* Scrapie-infizierten Mäusen zeigte die passive Immunisierung ebenfalls keine

Auswirkungen. Interessanterweise konnten dabei keine Anzeichen für Autoimmunreaktionen festgestellt werden (White, A. R. *et al.*, 2003).

Direkte Aussagen über die Effizienz von anti-PrP Immunantworten *in vivo* gestalteten sich, aufgrund der Selbsttoleranz gegen das Prion-Protein schwieriger. Immunzellen, die antigenspezifische Antikörper gegen Selbststrukturen bilden, werden normalerweise inaktiviert oder eliminiert. Zur Untersuchung der Selbsttoleranz und anti-PrP Immunantworten *in vivo*, wurde eine transgene Maus hergestellt, welche die variable Region der schweren Kette (V_H) des monoklonalen anti-PrP-Antikörpers 6H4 exprimiert (Korth, C. *et al.*, 1997; Heppner, F. L. *et al.*, 2001b). Daraus resultierte ein polyklonales B Zell-Repertoire, welches ausschließlich aus Antikörpern des IgM-Typs bestand und eine PrP-spezifische Ig-schwere Kette exprimiert. In transgenen *Prnp*^{0/0}-6H4 μ -Mäusen aber auch in *Prnp*⁺⁰-6H4 μ - und *Prnp*^{+/+}-6H4 μ -Mäusen, konnten spontane anti-PrP-Titer gemessen werden. Die B Zell-Toleranz korreliert mit dem exprimierten Level an Selbstantigen (Adelstein, S. *et al.*, 1991) bzw. der B Zell-Rezeptoraffinität oder -avidität (Tiegs, S. L. *et al.*, 1993). Der messbare, verzögerte Anstieg der anti-PrP Serumtiter in *Prnp*⁺⁰-6H4 μ -Mäusen könnte die negative Selektion von B-Zellen widerspiegeln, welche hoch-afide Antikörper gegen PrP^C exprimierten. Diese Hypothese konnte durch tg94-6H4 μ -Mäuse gestützt werden, welche PrP^C auf B und T Lymphozyten ~1000-fach überexprimieren und einen nahezu vollständigen Verlust an B Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Interessanterweise scheinen 6H4 μ -Mäuse nahezu resistent gegen eine peripher Prionen-Infektion zu sein (Tiegs, S. L. *et al.*, 1993; Heppner, F. L. und Aguzzi, A., 2004). Auch konnten keine Anzeichen von Autoimmunerkrankungen als Folge der induzierten anti-PrP Antikörper beobachtet werden (Heppner, F. L. *et al.*, 2001b).

Erste Erfolge mit aktiven Immunisierungsstrategien konnten mit Hilfe von Retrovirus-ähnlichen Partikeln (VLP), die ein C-terminales Fragment von PrP präsentierten verzeichnet werden. In *Prnp*^{0/0}-Mäusen, als auch in *Prnp*⁺⁰- und Wildtyp-Mäusen konnten, nach *i.v.* Injektion der retroviralen Partikel, PrP-spezifische IgM- und IgG-Titer nachgewiesen werden. (Nikles, D. *et al.*, 2005).

Die bisherigen Studien weisen darauf hin, dass die Selbsttoleranz von B Zellen gegen das Prionen-Protein nicht vollständig ist, und somit Möglichkeiten für immuntherapeutische Ansätze bestehen zu scheinen. Für die B Zell-Toleranz spielen die Konzentration des Antigens, die multivalente Präsentation des Antigens und die Affinität des BCR eine entscheidende Rolle. B Zellen mit einer geringen Affinität für Selbst-Antigene scheinen in der Lage Antikörper mit geringen Affinitäten zu exprimieren. T Zellen dagegen sind zumeist

vollständig tolerant gegenüber Selbst-Antigenen. Generell führt dies zu dem Modell, dass die Menge an exprimiertem Selbst-Antigen für die Induktion von B Zell-Toleranz höher liegt, als für die Induktion der T Zell-Toleranz.

6.3 Die V_HKL25/V_H6H4-Maus – Ein neues Mausmodell zur Untersuchung der immunologischen B Zell-Toleranz

Bisher sind die Mechanismen der immunologischen Toleranz und Autoimmunität nur ungenügend verstanden. Vor allem im Hinblick darauf, dass immuntherapeutische Ansätze gegen Selbst-Determinanten wie das Prion-Protein im Falle von CJD oder BSE aber auch Amyloid-ähnliche Protein-Ablagerungen bei Alzheimer und Parkinson in Betracht gezogen werden, ist es von enormer Bedeutung *in vivo* Modelle zur Untersuchung von Immuntoleranz und Autoimmunität zu generieren.

Mit Hilfe des 6H4 μ -Mausmodells (Heppner, F. L. *et al.*, 2001b) konnten bereits erste Erkenntnisse zur Entwicklung von PrP-spezifischen B Zellen und deren Toleranz gegen das zelluläre Prion-Protein gewonnen werden. Solange PrP^C in physiologischen Mengen exprimiert wurde, entwickelten sich PrP-spezifische B Zellen und spontane anti-PrP IgM-Titer, wobei es keine Anzeichen für autoimmune Reaktionen gab. Erst eine starke Überexpression von PrP^C führte zur Deletion von PrP-spezifischen B Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei physiologischer PrP-Expression und trotz intakter Immuntoleranzmechanismen, Spielräume für die Entwicklung von PrP-spezifischen B Zellen im Wildtyp existieren. Wichtige Schritte der B Zell-Entwicklung wie somatische Hypermutation, Isotypwechsel und immunologisches Gedächtnis waren bisher jedoch nicht adressierbar.

Um weiterführende Fragen zu beantworten war ein Projekt dieser Arbeit ein neues Mausmodell zu generieren, das die Analyse der B Zell-Toleranz und potentielle Autoimmunität gegen die Selbst-Determinante PrP erlaubt. Dieses Mausmodell soll ein leistungsstarkes Hilfsmittel werden, welches es erlaubt konstante PrP-spezifische Immunglobuline zu induzieren und, im Gegensatz zum 6H4 μ Mausmodell, den Wechsel von IgM zu allen anderen möglichen Isotypen zuzulassen. Da IgG oftmals ursächlich an der Entstehung von Autoimmunphänomenen beteiligt ist, soll die Untersuchung des potentiellen Risikos konstanter IgG-Produktion analysiert werden. Während im 6H4 μ Mausmodell alle B Zellen die Ig-schwere Kette des Antikörper 6H4 exprimierten, kann im neuen Mausmodell das Schicksal potentiell autoreaktiver Zellen in Gegenwart von B Zellen ermittelt werden, die

nicht-autoreaktive Spezifitäten exprimieren. Von den sich entwickelnden PrP-spezifischen B Zellen induzierten Immunglobulinen können anschließend die Feinspezifitäten und Bindungsaffinitäten ermittelt werden, sowie die Bedingungen, die zu immunologischer Toleranz oder Autoaggression führen, untersucht werden. Schließlich soll die potentiell schützenden Funktionen aktiv induzierter PrP-spezifischer Antikörperantworten nach einer Prioneninfektion analysiert werden, wobei die Prüfung verschiedenster Immunisierungsstrategien denkbar sind.

Das neue Mausmodell soll mittels zielgerichteten Mutagenese (*Gene-Targeting*), welches auf dem Prinzip der homologen Rekombination beruht, in murinen embryonalen Stammzellen (ES Zellen) durchgeführt werden. Die verwendete Targeting-Strategie basiert auf der Ersetzung aller 4 endogenen J_H-Elemente und des letzten D-Elements im genomischen Ig-schwere Kette Locus durch ein Kasette, welche zwei zueinander invers orientierte, rearrangierte V_H-Regionen enthält. Eine V_H-Region befindet sich dabei in der Nähe des genomischen *intron-enhancers* und stammt aus dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) spezifischen Antikörper KL25 (V_HKL25). In 5'-Richtung der V_HKL25-Region befindet sich invers orientiert, die PrP-spezifische variable Region der schweren Kette des Antikörpers 6H4 (V_H6H4). Diese Kasette soll durch loxP-sites, die in entgegengesetzter Orientierung vorliegen, flankiert werden (Abb. 5).

Mäuse, die aus derart veränderten ES Zellen abstammen, entwickeln B Zellen die zunächst die schwere Kette des anti-LCMV-spezifischen Antikörpers exprimieren. In einem nächsten Schritt können V_HKL25/V_H6H4flox-Mäuse mit einer induzierbar Cre-exprimierenden Mauslinie (Spiotto, M. T. *et al.*, 2003) gekreuzt werden. Nach Induktion der Cre-Expression kann die loxP-flankierte Kasette invertiert werden, was zur Expression der schweren Kette des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4 führt, während die Expression der V_HKL25 gestoppt wird. Die Kreuzung mit *mb1-cre* (Hobeika, E. *et al.*, 2006) führt dabei zur Expression der PrP-Spezifität in allen B Zellen, während die Kreuzung mit Cγ1-Cre-Mäusen (Casola, S. *et al.*, 2006) V_H6H4 ausschließlich in Gedächtnis-B Zellen exprimiert. Des Weiteren kann durch Verpaarung von V_HKL25/V_H6H4flox-Mäusen mit einer Cre-deleter-Mauslinie (Schwenk, F. *et al.*, 1995), eine konstitutive Expression der PrP-Spezifität erreicht werden.

6.4 Prionen, Zytokine und Virusinfektionen

6.4.1 Prionen und die Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe

Prionen sind in der Lage, lymphoide Kompartimente in infizierten Organismen zu infiltrieren. Nach intracerebraler (*i.c.*), oraler oder intraperitonealer (*i.p.*) Inokulation replizieren Prionen in der Milz, den Lymphknoten, den Peyer's Plaques und den Tonsillen (Beekes, M. und McBride, P. A., 2000; Mould, D. L. *et al.*, 1970; Eklund, C. M. *et al.*, 1967). Asplenie oder Splenektomie vor oder kurz nach einer Prionen-Infektion verlängern die Lebensdauer von Prionen-infizierten Mäusen (Clarke, M. C. und Haig, D. A., 1971). Die hohen Prionentiter in lymphoiden Organen sind allerdings nicht von signifikanten histopathologischen Veränderungen begleitet und es sind keine immunotoxischen Effekte durch hohe Prionen-Titer nachweisbar (Aguzzi, A. und Heikenwalder, M., 2005). Vor allem hämatopoetische Zellen, wie B Zellen, T Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen fördern den Transport von Prionen von der Peripherie zu den sekundären lymphatischen Organen, in denen sie akkumulieren und replizieren können, sowie die anschließende Neuroinvasion (Kaeser, P. S. *et al.*, 2001; Blattler, T. *et al.*, 1997; Klein, M. A. *et al.*, 1998). B Zellen z.B. scheinen jedoch die periphere Pathogenese durch indirekte Effekte, wie die Expression von Zytokinen und Chemokinen zu fördern. So exprimieren B Zellen Lymphotoxin α (LT α) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), welche für die Entwicklung und Erhaltung von follikulären dendritischen Zellen (FDC) nötig sind (Fu, Y. X. und Chaplin, D. D., 1999). FDCs akkumulieren PrP^{Sc} nach einer Prioneninfektion und die Replikation in der Milz ist von PrP^C exprimierenden FDCs abhängig (Kitamoto, T. *et al.*, 1991; Brown, K. L. *et al.*, 1999). Mäuse ohne FDCs oder Mäuse mit einer gestörten lymphoiden Mikroarchitektur zeigen eine verminderte Prionenreplikation in lymphoiden Organen, was zu einer kompletten Resistenz gegenüber einer Prioneninfektion führen kann (Prinz, M. *et al.*, 2002; Aguzzi, A. und Heikenwalder, M., 2005).

Im Gegensatz zu üblichen Infektionskrankheiten erscheint bemerkenswert, dass ein funktionsfähiges Immunsystem den Verlauf einer peripheren Prioneninfektion fördert, während die Störung verschiedener Komponenten des Immunsystems zu einer mehr oder minder starken Resistenz gegenüber einer Prioneninfektion führen kann.

6.4.2 Das TNF/LT Zytokinsystem

6.4.2.1 *Lymphotoxin α*

Die korrekte Struktur und Architektur der lymphatischen Organe spielt aber nicht nur für den Verlauf einer Prioneninfektion eine entscheidende Rolle. Das Immunsystem muss sicherstellen, dass infiltrierende Pathogene von den relativ wenigen, Antigen-spezifischen B und T Zellen erkannt werden können. Dies wird in den lymphatischen Organen u. a. durch hochgeordnete Strukturen, mit einer spezialisierten Mikroarchitektur gewährleistet. Vielzahlige Addressine, Integrine und Chemokine koordinieren dabei die Bewegungen und Positionierung von Immunzellen innerhalb der lymphatischen Organen, um eine effektive Immunantwort induzieren und aufrecht erhalten zu können (Goodnow, C. C., 1997).

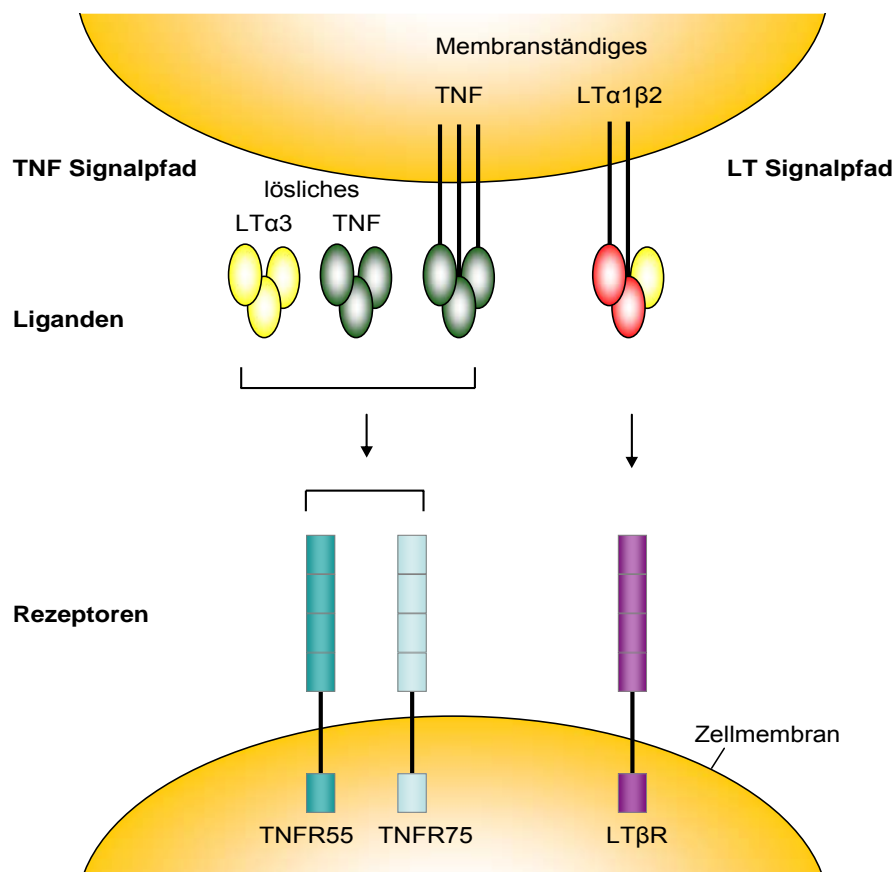


Abb. 3 Liganden und Rezeptoren des TNF/LT-Systems. Der TNF-Signalpfad kann über Lymphotoxin- α 3 (LT α 3), durch Bindung an die TNF-Rezeptoren, aktiviert werden. Das LT-System besteht aus dem LT β -Rezeptor (LT β R) und dem membranständigen Heterotrimer LT α 1 β 2 (nach Gommerman, J. L. und Browning, J. L., 2003).

Lymphotoxin α (LT α), ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie, ist ein seit Jahren bekanntes Zytokin, welches an der Differenzierung und Erhaltung von lymphoiden

Strukturen beteiligt ist. $LT\alpha$ kommt als lösliches Homotrimer ($LT\alpha_3$), welches an TNF-Rezeptoren bindet kann, vor (Aggarwal, B. B. und Natarajan, K., 1996) oder bildet mit $LT\beta$ ein membranständiges Heterotrimere ($LT\alpha_1\beta_2$) und wird somit zum Ligand des $LT\beta$ -Rezeptors ($LT\beta R$) (Ware, C. F. *et al.*, 1995) (Abb. 3). Lymphotoxin α und β werden von aktivierten T und B Zellen, sowie NK-Zellen exprimiert. Der $LT\beta R$ wird hauptsächlich von nicht-hämatopoetischen Zellen (Stromazellen), sowie myeloiden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen) exprimiert (Murphy, M. *et al.*, 1998; Browning, J. L. *et al.*, 1997).

Tabelle 2 Beschriebener Phänotyp von $LT\alpha$ -defizienten Mäusen (nach Tumanov, A. V. *et al.*, 2003 und Schneider, K. *et al.*, 2004)

Lymphotoxin α Defizienz		Phänotyp
Milz Architektur	Primäre B Zell Follikel	Fehlend
	Marginalzone	Fehlend
	Marginalzonen B Zellen	Reduziert bis fehlend
	B und T Zellzonen	Fehlende Zonen-Trennung
	Keimzentren	Fehlend
	FDC	Fehlend
B Zell Antworten		Verminderte IgG, IgA und IgE
		Vermindertes B Zell Gedächtnis
		Abgeschwächte Rekrutierung von DC und NK Zellen
T Zell Antworten		Erhöhte Gewebeeinfiltration autoimmuner Lymphozyten
		Erhöhte Auto-Ig
		Vermehrte Th1, verminderte Th2-Antworten
Mukosale Gewebe	Peyer's Plaque	Fehlend
	NALT	Verkleinert, abnormale Mikroarchitektur
Lymphknoten		Fehlend

LT wird zur Kommunikation zwischen Stromazellen und Lymphozyten, nicht aber für die Kommunikation zwischen B und T Zellen untereinander benötigt. Der $LT\alpha\beta$ - $LT\beta R$ Signalfad ist unentbehrlich für die Entwicklung und Erhaltung sekundärer lymphatischer Organe, wie peripheren Lymphknoten und Peyer's Plaques (Tabelle 2). In $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen entwickeln sich keine Lymphknoten und es zeigt sich eine Beeinträchtigung der Milzentwicklung (Mebius, R. E., 2003; Spahn, T. W. *et al.*, 2005). Auf B Zellen exprimiertes LT dient zur Erhaltung von FDC, die in B Zell-Follikeln essentiell für die Positionierung von B Zellen, der Antigenpräsentation und für effiziente Keimzentrum-Reaktionen sind (Gommerman, J. L. und Browning, J. L., 2003). Das Fehlen der $LT\alpha$ Expression führt zum Verlust eines funktionalen FDC-Netzwerkes (Mackay, F. und Browning, J. L., 1998). Eine andere LT-abhängiges Mikroumgebung ist die Marginalzone der Milz. Dieses Kompartiment filtert Pathogene aus dem Blut und präsentiert diese B Zellen. Ein $LT\alpha$ -*knockout* führt zum Verlust von myeloiden Zellen in der Marginalzone und von Marginalzonen-B Zellen, welche sich durch die schnelle Reaktion auf zirkulierende Antigene auszeichnen (Mackay, F. *et al.*, 1997). Darüber hinaus führt die Ablation von $LT\alpha$ zu einer Abnahme und einer gestörten Organisation von dendritischen Zellen in der T Zell-Zone der Milz (Wu, Q. *et al.*, 1999). Die LT-Expression hat ebenfalls Einfluss auf die Struktur und Funktionalität mukosaler lymphatischer Gewebe, was sich in einem Verlust von Peyer's Plaques, mukosaler Lymphknoten und der Organisation des nasopharyngeal-assoziiertem lymphatischen Gewebes (NALT) zeigt. NALT ist ein einzigartiges murines Organ, welches vermutlich das Analog zu humanen Tonsillen darstellt (Goeringer, G. C. und Vidic, B., 1987). Es zeichnet sich durch seine physikalische Nähe zur externen Umwelt aus und vermittelt die Induktion von Immunantworten gegen eindringende Pathogene (Wu, H. Y. und Russell, M. W., 1993). Die Ablation von $LT\alpha$ hat generelle Auswirkungen auf die Immunkompetenz des Organismus. So konnte gezeigt werden, dass $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse eine eingeschränkte Immunantwort gegen bakterielle Infektionen mit *Mycobacterium bovis* oder *Citrobacter rodentium* induzieren, wobei die Infektion zumeist letal verläuft (Bopst, M. *et al.*, 2001; Spahn, T. W. *et al.*, 2004). Die Deletion von $LT\alpha$ führt zu einer verzögerten Beseitigung und höheren Sensitivität gegenüber viralen Infektionen mit Influenza A (Lund, F. E. *et al.*, 2002) oder Theiler's Virus (Lin, X. *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte eine Beeinträchtigung der Effektorfunktionen von zytotoxischen $CD8^{+}$ T Zellen, nach Infektion mit Herpes simplex Virus (HSV), beobachtet werden (Kumaraguru, U. *et al.*, 2001).

6.4.2.2 Tumornekrosefaktor α

Lymphotoxin α und Tumornekrosefaktor α (TNF α) sind zwei von mehr als 40 Vertretern eines Zytokinsystems, der TNF/TNFR-Superfamilie, welche pleiotrope Funktionen in der Regulierung des Immunsystems ausüben. Mitglieder der TNF-Familie konnten bisher nur aus Säugetieren und Fischen isoliert werden. TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten, NK Zellen und aktivierten T Zellen sekretiert. Allerdings wurde die Expression von TNF α auch in Astrozyten, Mikroglia, Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen. TNF α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin mit einem weiten Spektrum biologischer Funktionen. Es regelt in lokalen und systemischen Entzündungen die Aktivität verschiedener Immunzellen, kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Einer der bekanntesten Effekte ist die von TNF α induzierte, pro-apoptotische Makrophagen-vermittelte Zytotoxizität. (Goetz, F. W. *et al.*, 2004).

TNF α ist ein Typ II Transmembran-Glykoprotein, mit einem extern der Zellmembran liegendem C-Terminus und einer zytoplasmatischen Domäne. TNF α kann durch die Protease TNF-alpha konvertierendes Enzym (TACE) von der Zellmembran gelöst werden und als lösliche Form agieren (Blobel, C. P., 1997) (Abb. 3). Die meisten bisher bekannten Effekte von TNF α lassen sich auf diese lösliche Form zurückführen. TNF α kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden. Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1) wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und kann von der membrangebundenen Form, als auch vom löslichen TNF α -Homotrimer aktiviert werden. Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 (TNFR2) wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert und kann nur durch das TNF α -Homotrimer aktiviert werden. TNFR1 und TNFR2 können ebenfalls proteolytisch gespalten werden und als lösliche Form die Aktivität von TNF α modulieren (MacEwan, D. J., 2002).

Nach Kontakt mit dem Liganden formen TNF-Rezeptoren Trimere, was zur Dissoziation des inhibitorischen Proteins SODD (*silencer of death domain*) von der intrazellulären Todes-Domäne führt (Abb. 4). Die anschließende Bindung des Adaptorproteins TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) an die Todesdomäne ist der Initiator weiterer Proteinbindungen, welche diverse Signalfade aktivieren können. Dazu gehört u. a. die Aktivierung von nukleärem Faktor- κ B (NF- κ B) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), welche an entscheidenden immunmodulatorischen Prozessen teilhaben (Wajant, H. *et al.*, 2003, Chen, G. und Goeddel, D. V., 2002). Nach Überexpression kann TRADD den NF- κ B Signalweg aktivieren und *in vitro* Apoptose induzieren (Hsu, H. *et al.*, 1995). Die Todesdomäne von TRADD besitzt eine hohe Homologie zu den Todesdomänen von FADD (Boldin, M. P. *et al.*, 1995; Chinnaiyan, A. M. *et al.*, 1995) und RIP1 (Stanger, B. Z. *et al.*,

1995), welche über Interaktionen der Todesdomänen an TRADD binden können (Hsu, H. *et al.*, 1996a; Hsu, H. *et al.*, 1996b). Des Weiteren kann TRADD mit STAT1- α interagieren und beeinflusst dadurch die Interferon- γ Signaltransduktion, wobei es scheinbar als Negativregulator fungiert (Wesemann, D. R. *et al.*, 2004).

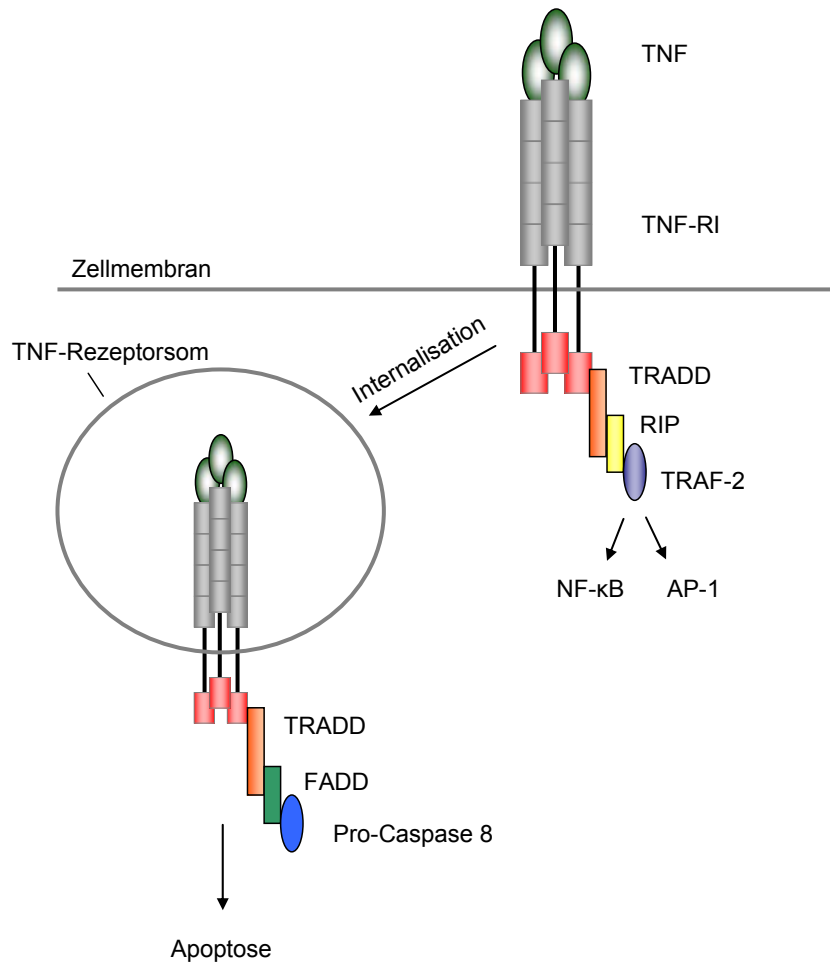


Abb. 4 Signaltransduktion durch TNF-Rezeptor I. Nach Wechselwirkung von TNF und TNFRI, bindet das Adaptorprotein TRADD an die intrazelluläre Todesdomäne und rekrutiert weitere Signal-Komplexe, wie z. B. das Rezeptor-interagierende Protein (RIP) und den TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF2), welcher die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 induziert. Ein anderer Rezeptorkomplex wird nach Internalisierung des aktivierten TNF/TNFR-Komplexes gebildet (TNF-Rezeptorsom). Während der Endozytose binden FADD und Caspase-8, was die TNF-vermittelte Apoptose induziert (nach Hehlhans, T. und Pfeffer, K., 2005).

Ähnlich wie LT spielt TNF eine Rolle bei der lymphoiden Organogenese. So weisen TNF oder TNFR1-defiziente Mäuse eine reduzierte Anzahl Peyer's Plaques, sowie eine gestörte Milzarchitektur auf. Diese kennzeichnet sich durch das Fehlen von FDC und Keimzentren, was zu einer partiellen Beeinträchtigung von IgG-Antworten führt (Pasparakis, M. *et al.*, 1996; Pfeffer, K. *et al.*, 1993).

Es ist bekannt dass nach Ablation von TNF α die Immunantwort gegen Pathogene beeinträchtigt ist. Studien in Mausmodellen zeigen, dass TNF α eine wichtige schützende Komponente bei bakteriellen Infektionen darstellt. So sind TNF α -*knockout* Mäuse (TNF $\alpha^{-/-}$) anfällig für Infektionen mit *M. tuberculosis*, *S. aureus* und *L. monocytogenes* (Pasparakis, M. *et al.*, 1996, Flynn, J. L. *et al.*, 1995, Hultgren, O. *et al.*, 1998).

6.4.3 Interferone

Interferone stellen eine Multigen-Familie von induzierbaren Zytokinen dar. Typ I Interferon (IFN) wurde 1957 erstmalig als Virus-hemmendes Protein in Influenza-infizierten embryonalen Hühnerzellen beschrieben (ISAACS, A. und LINDENMANN, J., 1957). Interferone werden zurzeit in zwei Klassen eingeteilt. Die Type I IFN beinhalten heute verschiedene Subtypen, von denen IFN α und IFN β die prominentesten Mitglieder darstellen. Als Typ II IFN wird das funktional ähnliche IFN γ bezeichnet, das 1965 in Mitogen-aktivierten humanen T Zellen nachgewiesen werden konnte (WHEELLOCK, E. F., 1965). Nach einer Virusinfektion können Typ I Interferone von nahezu jeder Zelle exprimiert werden, wogegen IFN γ nur von bestimmten Zellen des Immunsystems, wie Natürlichen Killer (NK) Zellen, CD4⁺ Th1 Zellen und CD8⁺ Suppressor-T Zellen produziert wird (Bach, E. A. *et al.*, 1997).

Typ I Interferone sind Liganden des Typ I IFN Rezeptors (IFNAR) (Branca, A. A. und Baglioni, C., 1981). Der heterodimere IFNAR besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, die der Klasse II Zytokinrezeptor-Familien angehören (Lutfalla, G. *et al.*, 1992). Beide Untereinheiten sind an der Bindung des Liganden und der Signaltransduktion beteiligt. IFN bindet zunächst an die IFNAR2-Untereinheit, was zur anschließenden Komplexbildung mit IFNAR1 führt (Lamken, P. *et al.*, 2004). IFN γ zeigt strukturell keine Ähnlichkeit mit Typ I Interferonen und bindet an den unigen Interferon γ -Rezeptor (IFNGR), welcher sich aus den Untereinheiten IFNGR-1 und IFNGR-2, zusammensetzt und ebenfalls nach Ligandenbindung heterodimerisiert (Bach, E. A. *et al.*, 1997).

Die Ablation von IFNAR zeigt die elementare Funktion der Interferone in der Pathogenese von Virusinfektionen. Interferonrezeptor-defiziente Mäuse (IFNAR $^{-/-}$) sind, trotz eines ansonsten intakten Immunsystems, hoch anfällig gegenüber Infektionen mit verschiedenen Viren, wie z. B. Vaccinia-, Lymphozytäres Choriomeningitis- (LCMV) oder Vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV) (Samuel, C. E., 2001; Muller, U. *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu zeigen IFN γ -Rezeptor defiziente Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber bakteriellen

Infektionen, was die funktionalen Differenzen zwischen Typ I und Typ II Interferonen unterstreicht (Lu, B. *et al.*, 1998).

Bereits wenige Stunden nach einer Virusinfektion werden im Rahmen der angeborenen Immunität Zytokine wie Type I Interferone exprimiert, die das Überleben des Organismus sicherstellen (Kawai, T. und Akira, S., 2006). Während nahezu jedes Gewebe auf Typ I IFN mit der Expression einer Vielzahl von IFN-induzierten Genen antworten kann, sind nur wenige spezialisierte Zellen in der Lage signifikante Mengen an Typ I Interferonen *in vivo* zu produzieren (Samuel, C. E., 2001; Barchet, W. *et al.*, 2002; Colonna, M. *et al.*, 2004). Nach Infektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) stellen plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) die hauptsächliche Quelle von Typ I Interferonen dar, wobei auch myeloide dendritische Zellen (mDC) in der Lage sind Typ I Interferone zu produzieren (Barchet, W. *et al.*, 2002; Barchet, W. *et al.*, 2005).

Neben der antiviralen Wirkung, zeigen Typ I Interferone verschiedene pleiotrope Effekte. Sie können antiproliferativ wirken, steuern die Expression weiterer Zytokine bzw. Zytokinrezeptoren und haben Einfluss auf apoptotische Vorgänge (Petricoin, E. F., III *et al.*, 1997; Marrack, P. *et al.*, 1999; Strengell, M. *et al.*, 2004). So können Typ I Interferone durch direkte und indirekte Effekte das Verhalten von Lymphozyten steuern. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass B Zellen eine verstärkte IgM-Antwort, nach Co-Stimulation mit IFN α/β , ausbilden können (Braun, D. *et al.*, 2002). *In vivo* führte die Behandlung mit Typ I Interferon zu einer verstärkten IgG-Antwort gegen ein Influenza-Untereinheit-Vakzin und gegen Hühnergammaglobulin (CCG) (Proietti, E. *et al.*, 2002; Le, Bon A. *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde berichtet, dass Typ I IFN die Differenzierung zu Plasmazellen fördert (Jego, G. *et al.*, 2003). Ob Typ I IFN einen Einfluss auf die antivirale Antikörperantwort hat, scheint vom infizierenden Virus abzuhängen. Die Infektion mit dem nicht-zytophatischen Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV), welches die Expression signifikanter Mengen Typ I IFN induziert, führt in IFNAR^{-/-} und WT-Mäusen zu Antikörperantworten mit ähnlichem Ausmaß und Isotyp-Muster (Malmgaard, L. *et al.*, 2002; van den Broek, M. F. *et al.*, 1995). Dagegen führt eine Infektion mit einem gering pathogenen Influenza-Stamm, welcher sowohl von IFNAR^{-/-}, als auch WT-Mäusen toleriert wird, in IFNAR^{-/-} Mäusen zu einer Reduzierung von Influenza-spezifischen B Zellen, zu einem veränderten Ig Isotyp-Muster und zu einer Beeinträchtigung der Differenzierung zu Plasmazellen (Coro, E. S. *et al.*, 2006). Darüber hinaus hat Typ I Interferon einen direkten Effekt auf die klonale Expansion von CD8⁺ T Zellen und die Bildung von Gedächtnis-T Zellen (Kolumam, G. A. *et al.*, 2005). Einige der indirekten Effekte von Typ I IFN sind vermutlich auf aktivierte Antigen-

präsentierende Zellen (APC) zurückzuführen, welche verschiedene Lymphozyten-beinflussende Zytokine produzieren (Le, Bon A. *et al.*, 2001; Zhang, X. *et al.*, 1998).

IFN γ spielt eine wichtige Rolle bei angeborenen und adaptiven Immunantworten. Es stimuliert die Zell-vermittelte Immunität durch NK Zellen, aktiviert Makrophagen und zytotoxische T Zellen (Boehm, U. *et al.*, 1997). IFN γ moduliert die Differenzierung in Th1 oder Th2 T Zellen und kann somit die Ausbildung einer zellulären oder humoralen Immunantwort beeinflussen (Sen, G. C., 2001). Neben den antimikrobiellen Effekten spielt IFN γ auch beim Schutz vor viralen Infektionen eine Rolle. So unterstützt IFN γ den Langzeitschutz nach Infektion mit Herpes simplex Virus (Cantin, E. *et al.*, 1999b; Muller, U. *et al.*, 1994).

Generell scheinen die Signalpfade und Zielgene von IFN α/β und IFN γ auf verschiedenen Stufen zu überlappen, was die Möglichkeit zu synergistischen oder antagonistischen Effekten zulässt. So ist z. B. Typ I IFN in der Lage klassische Typ II IFN Signalmoleküle, wie das STAT1 Homodimer zu aktivieren und somit die Transkription von Typ II IFN Zielgenen zu induzieren (Min, W. *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu ist IFN γ in der Lage das Signalmolekül ISGF3 zu aktivieren, welches die Expression von Typ I IFN induziert und somit die Wirkung von IFN α/β verstärken kann (Kawakami, T. *et al.*, 1995; Yoneyama, M. *et al.*, 1996).

6.5 Vesikuläres Stomatitis Virus

Das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) ist ein Einzelstrang (-) RNA Virus der Gattung *Vesiculovirus* und gehört zur Familie der *Rhabdoviridae* (Dietzschold, B. und Rupprecht, C. E. Fu Z. F. und Koprowski H, 1996). VSV kodiert für 5 Strukturproteine (N, L, P, M und G), wobei die Virushülle aus dem Matrix (M) Protein und einem von der Wirtszelle abstammenden Lipid-*bilayer* besteht. Das Hüllglykoprotein (G) formt in Abständen von 5-10 nm eine charakteristische, parakristalline Oberfläche (Bachmann, M. F. *et al.*, 1995). Neben dem häufig experimentell verwendeten Virusstamm Indiana (VSV-IND), existieren weitere Serotypen mit einem breiten Wirtsspektrum von Säugetieren, Vögeln und Insekten. Die Hauptwirte sind Pferd, Rind und Schwein, in denen VSV eine durch vesikuläre Läsionen im Mundbereich gekennzeichnete Krankheit verursacht. Dagegen kann eine Infektion mit VSV im Menschen Influenza-ähnliche Symptome hervorrufen. WT Mäuse sind in der Lage, eine intravenöse Infektion mit bis zu 10^8 pfu (plaque forming units) zu überleben. VSV ist ein neurotropes Virus, das bevorzugt in den Zellen des ZNS repliziert (Sabin, A. B. und Olitsky, P. K., 1937; van den Pol, A. N. *et al.*, 2002). Durch eine intranasale Applikation kann VSV

über die olfaktorischen Rezeptorneuronen innerhalb von 12-24 Stunden den *Bulbus olfactorius* infizieren (Reiss, C. S. *et al.*, 1998b) und führt bereits ab 10^4 pfu zu einer letalen Enzephalitis, welche durch Hinterlaufparalyse, Meningitis, Ventrikulitis und Nekrosen im Kortex gekennzeichnet ist (Forger, J. M., III *et al.*, 1991; Miyoshi, K. *et al.*, 1971).

Eine VSV-Infektion wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel von Typ I Interferonen und neutralisierenden Antikörpern kontrolliert. Die schnelle Induktion von Typ I Interferonen ist zum Überleben von Mäusen unabdingbar, da mit geringen Dosen VSV infizierte IFNAR^{-/-} Mäuse innerhalb weniger Tage der Krankheit erliegen (Muller, U. *et al.*, 1994). Darüber hinaus stellen VSV-neutralisierende Antikörper wichtige Faktoren zum Schutz gegen VSV-Infektionen dar, da B Zell-defiziente Mäuse nach wenigen Tagen an der Infektion versterben (Thomsen, A. R. *et al.*, 1997). Die humorale Immunantwort ist nahezu ausschließlich gegen das hochrepetitiv angeordnete VSV-G-Protein gerichtet, welches IgM quervernetzt und eine T Zell-Hilfe unabhängige IgM-Antwort induziert (Bachmann, M. F. *et al.*, 1995; Kalinke, U. *et al.*, 1996, Roost, H. P. *et al.*, 1996). Da CD4⁺ T Zell-depletierte Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer VSV Infektion aufweisen, scheint der Langzeitschutz gegen VSV durch einen Isotypenwechsel zu IgG unterstützt zu werden. (Bachmann, M. F. und Zinkernagel, R. M., 1997).

7 Material und Methoden

7.1 Geräte

Tabelle 3 Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav		KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
CO ₂ - Begasungsbrutschrank	Cytoperm	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	LSRII	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einfrierbox	Mr. Frosty	Nunc, Karlsruhe
Einkanalpipette	Multipette plus 4981	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanalpipetten 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100µl, 50-200 µl, 100-1000µl	Reference variabel	Eppendorf AG, Hamburg
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Köln
Homogenisator	FasPrep	MP Biomedicals, Straßburg, Frankreich
Gammastrahlen-Quelle	OB29	STS-Buchler, Braunschweig
Handstückzähler		IVO, Villingen-Schwenningen
Heizblock mit Schüttelfunktion (Thermomixer)	Eppendorf 5437, Eppendorf compact	Eppendorf AG, Hamburg
Hybridisierungssofen	Hybridisierer HB 1D	Barloworld Scientific Ltd., Stone, Großbritannien
Injektionskäfig		Harnischmacher, Kassel
Kamera	AxioCam	Carl Zeiss AG, Jena

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kühl- und Gefrierschränke (4°C und -20°C)		Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz
Magnetrührer	RCT Basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipetten	Research multi 3114	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop	Axiovert25,	Carl Zeiss AG, Jena
Mikroskop	Axiolab,	Carl Zeiss AG, Jena
Mikrowelle	9025E	Privileg, Fürth
Membranpumpe		Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
PCR-Cycler	Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research, Waltham, MA, USA
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Egelsbach
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Reagenzglasschüttler		VWR International GmbH, Darmstadt
Rührfische		VWR International GmbH, Darmstadt
Spannungsgerät	Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer	Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech
Sterilbank	Steril Gard II Advance	The Baker Company
Tiefkühlschränke (-80°C)		New Brunswick Scientific, Nürtingen
Tischzentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Ultraschallbad	Sonorex RK 100	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Bestrahlungsgerät	Crosslinker CL1	Herolab GmbH, Wiesloch
Vacuumblotter	Model 785	Bio-Rad, München
Vakuumpumpe	Vacunsafe	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Waage	LP 820	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad		Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Wasserbad mit integriertem Schüttler		Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Zellelektroporator	ECM 630	BTX, San Diego, USA

7.2 Verbrauchsmittel und sonstige Materialien

Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmittel und sonstige Materialien

Verbrauchsmittel	Hersteller
1 ml Spritzen mit integrierter Nadel (Insulinspritzen)	Braun, Melsungen
5 ml Einmalspritzen	Braun, Melsungen
50 ml Einmalspritze	Braun, Melsungen
Bechergläser, verschiedene Größen	Schott, Mainz
Combitips (1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläschen	VWR International GmbH, Darmstadt
Drigalskyspatel	VWR International GmbH, Darmstadt
Kryo-Röhrchen (1ml, mit Innengewinde)	Nunc, Karlsruhe

Verbrauchsmittel	Hersteller
Einmal-OP-Mundschutz Coldex	Procter & Gamble, Schwalbach
Einweghandschuhe aus Latex, Manufix Sensitiv	Braun, Melsungen
Einweghandschuhe, TNT Blue Nitril	Ansell, Aalst, Belgien
Einwegkanülen, verschiedene Größen	Braun, Melsungen
Erlenmayerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen (Polystyren)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Glasflaschen mit Schraubdeckel 1 l, 500 ml, 100 ml und 10 ml	Schott, Mainz
Glas mit Deckel	Schott, Mainz
Glasstäbe	VWR International GmbH, Darmstadt
Kanülensammler Medibox	Braun, Melsungen
Microspin-Säulen S-200	GE Healthcare, Freiburg
Mikroliterreaktionsgefäß, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher und Schuell, Dassel
Nitrozellulosemembran Hybond XL	GE Healthcare, Freiburg
Parafilm „M“	American National Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt
PCR Platten twin tec PCR Plate 96	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
PCR Reaktionsgefäß-Strips, 8er und 12er	ABgene, Hamburg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Essen
Phase Lock Gel light, 2 ml, 15 ml, 50 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, blau, gelb und weiß	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmittel	Hersteller
Pipettenspitzen, gestopft (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Plastikpipetten 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml	Grainer Bio-One, Essen
Präparationsbesteck	Hauptner/Herberholz, Solingen
Rasierklingen Apollo	Herkenrath, Solingen
Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Grainer Bio-One, Essen
Röntgenfilm (Hyperfilm M Enveloped)	GE Healthcare, Freiburg
Spritzenvorsatzfilter Qualilab 0,22 µm & 0,45 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Standzylinder	Schott, Mainz
Steritop Filter GP 0,22 µm	Millipore GmbH, Schwalbach
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen, T175	Grainer Bio-One, Essen
Zellkulturplatten, 6 well, 24 well, 96 well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Grainer BioOne, Essen
Zellsiebe Filicon, 70 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

7.3 Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer

Tabelle 5 Chemikalien, Lösungsmittel, Fertigpuffer

Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer	Hersteller
0,5 M EDTA	PEI Medienküche, Langen
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
1 M HEPES	PEI Medienküche, Langen
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
10x PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PEI Medienküche, Langen

Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer	Hersteller
10x TBE	PEI Medienküche, Langen
1x PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	PEI Medienküche, Langen
1x PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Gibco, Karlsruhe
20x SSC	PEI Medienküche, Langen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Chlorophorm, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Desderman	Schülkes & Mayr, Norderstedt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DNA Polymerase 1	New England Biolabs, Frankfurt
dNTP	New England Biolabs, Frankfurt
EcoPol Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Entwickler und Fixierer	Agfa, Köln
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
ExpressHyp™ Hybridization Solution	Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich

Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer	Hersteller
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Flow	PEI Medienküche, Langen
FACS Rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Isofluran	Baxter, München
Isopropanol, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Isotonische Natriumchloridlösung (0,9%)	PEI Medienküche, Langen
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methylcellulose (Methocel MC)	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%ige Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol, Tris equilibriert pH 8.0	Sigma-Aldrich, München

Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer	Hersteller
Redivue™ ³² P-dCTP	GE Healthcare, Freiburg
Restriktionsendonuklease-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
Rompun® TS (Xylazin)	Bayer AG, Leverkusen
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Merck KGaA, Darmstadt
Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Terralin Liquid	Schülkes & Mayr, Norderstedt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau-Lösung	Gibco, Karlsruhe
Tween	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München
Zyklodestwasser (ddH ₂ O), autoklaviert	PEI, Medienküche

7.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 6 Puffer und Lösungen

Für die Molekularbiologie

TE-Puffer	10 mM Tris, pH8 ,0
	0,1 mM EDTA
5x DNA-Ladepuffer:	30% Glycerin
	0,125% Bromphenolblau
	0,125% Xylencyanol
	ddH ₂ O

DEPC-Wasser:	1% DEPC wurden in ddH ₂ O gegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert.
Lysepuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
Chloroform/Isoamylalkohol:	Chloroform und Isoamylalkohol wurden in einem Verhältnis von 24:1 (v/v) gemischt.
10 M Ammoniumacetat:	10 M Ammoniumacetat in ddH ₂ O
3 M Natriumacetat, pH 5,2:	3 M Natriumacetat in ddH ₂ O, der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

Für Southern Blot

Ethidiumbromidbad:	0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE
Denaturierungslösung:	0,25 M HCl
Depurinierungslösung:	0,5 M NaOH, 0,5 M NaCl
Equilibrierungspuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 7.4 0,5 M NaCl
Waschpuffer 1:	2x SSC 0,05% SDS
Waschpuffer 2:	0,1x SSC 0,1% SDS
Lösung zur Entfernung der Southern Blot-Sonde	0,5% SDS in ddH ₂ O

Zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern und Virustitern

2% Methylcellulose: 15 g Methocel MC werden in 750 ml ddH₂O über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst und anschließend autoklaviert.

1% Methylzellulose-Lösung in 1x MEM: Für 100 ml:
50 ml 2% Methylcellulose
10 ml 10x MEM
5,86 ml Natriumbicarbonatlösung (7,5%)
2,5 ml 1M HEPES
31,6 ml steriles ddH₂O

Kristallviolett-Lösung: 5 g Kristallviolett
50 ml Formaldehydlösung (30%)
0,5 l Ethanol
8 g NaCl
ad 1 l mit ddH₂O

Sonstiges

Langzeitnarkoselösung: 1 ml Ketamin 10%
0.25 ml Rompun 2%
5 ml sterile 0,9% NaCl-Lösung

4% PFA-Lösung (Formalin): 40 g PFA werden in 1 l PBS bei 70°C gelöst. Sollte die Lösung nicht klar sein, werden ein paar Tropfen Natronlauge hinzugegeben. Aliquotiert wurde das Formalin bei -20°C gelagert.

Fixierlösung (FACS): 10 g PFA werden in 1 l PBS bei 70°C gelöst. Sollte die Lösung nicht klar sein, werden ein paar Tropfen Natronlauge hinzugegeben. Aliquotiert wurde das Formalin bei -20°C gelagert.

FACS-Puffer: 10 g BSA

0,15 g Natriumazid

20 mM EDTA

ad 500 ml mit PBS

Puffer wurde steril filtriert.

7.5 Medien und Medienzusätze

Tabelle 7 Medien und Zusätze

Medium	Hersteller
10x MEM	Gibco, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin (100 mg/ml in ddH ₂ O)	PEI, Medienküche
Cymevene (1000x) 0,54 μ g/ml in PBS	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 4.500 mg/l Glukose	Gibco, Karlsruhe
Earle's MEM	Biochrom, Berlin
Einfriermedium:	10% DMSO in 1x MEM
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (ES Zell getestet)	Gibco, Karlsruhe
Geneticin 300 μ g/ml in ddH ₂ O	
GlutaMAX	Gibco, Karlsruhe
LB-Agarplatten	PEI, Medienküche
LB-Medium	PEI, Medienküche
Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	Gibco, Karlsruhe
Natriumbicarbonatlösung (7,5%)	Gibco, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100mM)	Gibco, Karlsruhe

NZY ⁺ -Medium	PEI, Medienküche
Penicillin (5000u/ml)/Streptomycin (5000µg/ml)-Lösung	Gibco, Karlsruhe
Verozell-/BHK-Medium:	MEM mit 5% FCS und 1% Glutamax

7.6 Antikörper

Tabelle 8 Verwendete Antikörper

Antikörper	Quelle
Hamster anti Maus IgG1 CD11c APC	BD Pharmingen, #550261
Ratte anti Maus IgG2b F4/80 RPE	Serotec, #MCA497PE
Ratte anti Maus IgG2a MOMA-1 FITC	Serotec, #MCA947F
Ratte anti Maus IgG2b MOMA-2 FITC	Serotec, #MCA519F
Ratte anti Maus IgG2b CD16/CD32	BD Pharmingen, #553142
anti Maus IFNAR1 Antikörper (MAR1)	bereitgestellt durch Bob Schreiber (Sheehan, K. C. <i>et al.</i> , 2006)

7.7 Enzyme

Tabelle 9 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
2.5 M Trypsin-Melnick	Medienküche PEI, Langen
<i>Calf intestinal phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Frankfurt
HotStar Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Phusion™ DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinase K	Roche, Mannheim
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt

T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin (0,25%)	Gibco, Karlsruhe

7.8 Kits

Tabelle 10 Verwendete Kits

Kit	Hersteller	Verwendung
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden	Präparation genomischer DNA aus Mausgeweben
Endo Free Plasmid Kit	Qiagen, Hilden	Präparation endotoxinfreier DNA zur Transfektion von eukaryotischen Zellen
IFN β ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA	Nachweis von INF β in Mausseren
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden	Präparation großer Mengen Plasmid-DNA (~10mg)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	DNA Extraktion aus Agarosegelen / Entsalzen oder Konzentrieren von DNA-Lösungen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden	Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (~20 μ g)
Rediprime II Random Prime Labelling System	GE Healthcare, Freiburg	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

7.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden HPLC aufgereinigt bei Sigma-Genosys in Steinheim hergestellt.

Tabelle 11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'-3')	Erläuterung
p322	TGGTTCTTTGACTATTGGGGG	Identifikation positiver ES Zell Klone
pHE3	GGGGAACTAGAACTACTCAAGCT	Identifikation positiver ES Zell Klone / Southern Blot Sonde
pHE5	AGGTCTGGTGGAGCCTGCAA	Southern Blot Sonde
p5'DQ52	CCCACCATCACAGACCTTTC	Deletion der Neo-Kassette
p6H4 ^{5'}	ATGGGATGGAGCTGGATC	Deletion der Neo-Kassette
pVDJ	TTCTGTGCAAATGGTTACCTG	Deletion der Neo-Kassette
p1453	TCAGCCCATTGCGCCGCAAGCTC	Deletion der Neo-Kassette
PrP5`for_ins	CTGAGTATATTTTCAGAACTG	Nachweis des LT α / β Transgens
LT α _rev1	CAGAGAAAACCACCTGGGAG	Nachweis des LT α Transgens
LT β _rev1	GAGTCTCTGAGAGGCTAGAG	Nachweis des LT β Transgens
oIMR0013	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	Nachweis des LT α knockouts
oIMR0014	AGGTGAGATGACAGGAGATC	Nachweis des LT α knockouts
p#170	TATACGAAGTTATTAGGTCTGAAG	Identifikation positiver ES Zell Klone
p#168	AATGCTTGTGGTTGGTTGAC	Identifikation positiver ES Zell Klone
pUK#95	TGCCAGTTCCTCCAGATATCCAAG	Deletion der Neo-Kassette
pNeo-O-S	GCTGGCCCTACTCACACTTC	Deletion der Neo-Kassette

7.10 Zelllinien

Tabelle 12 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293 FT	American Type Culture Collection (ATCC)
IB10	Subklon der 129/Ola ES Zelllinie E14.1 (Robanus-Maandag, E. <i>et al.</i> , 1998)
<i>Mouse embryonic fibroblast</i> (MEF)	primäre Fibroblasten wurden aus Tag 13 Embryonen von IFNAR ^{-/-} C57BL/6 Tieren gewonnen.
Vero cells (<i>African green monkey kidney</i>)	American Type Culture Collection (ATCC)

7.11 Mauslinien

Tabelle 13 Mauslinien

Genotyp	Background	Referenz
C57BL/6 (Wildtyp)		Charles River, PEI
IFNAR ^{-/-}	C57BL/6	Muller, U. <i>et al.</i> , 1994
IFNAR ^{flox/flox}	C57BL/6	Kamphuis, E. <i>et al.</i> , 2006
LysMCre-IFNAR ^{flox/flox}	C57BL/6	König, M. <i>et al.</i> , unveröffentlicht
LTα ^{-/-}	C57BL/6	Prinz, M., Göttingen
C57BL/6 LckLTα/β	C57BL/6	Prinz, M., Göttingen
LTα ^{-/-} LckLTα/β	C57BL/6	Prinz, M., Göttingen
TNFα ^{-/-}	C57BL/6	Pasparakis, M. <i>et al.</i> , 1996
TRADD ^{-/-}	C57BL/6	Ermolaeva <i>et al.</i> , 2008

7.12 Bakterien und Viren

Tabelle 14 Bakterien und Viren

Bakterien und Viren	Herkunft
Vesikuläres Stomatits Virus (VSV), Serotyp Indiana (Mudd-Summers Isolat)	ursprünglich von D. Kolakofsky, Universität Genf, Schweiz.
<i>E. coli</i> , XL2-blue, ultrakompetente Zellen	Stratagene, Amsterdam, NL

7.13 Computerprogramme

Tabelle 15 Computerprogramme

Programm	Hersteller
Graphpad Prism 4.0	Graphpad Software Inc., San Diego, USA
VectorNTI Advance 9.0	Invitrogen, Karlsruhe
BD FACS DIVA Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

7.14 Molekularbiologische Methoden

7.14.1 Fällung von Nukleinsäuren

7.14.1.1 Fällung mit Ethanol

Ein Volumen DNA in ddH₂O oder TE-Puffer gelöst, wurde mit 1 µl Glykogen, 2 ½ Volumen kaltem Ethanol abs. (-20°C) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4°C für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit kaltem 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser bzw. TE-Puffer resuspendiert.

7.14.1.2 Fällung mit Isopropanol

Ein Volumen DNA wurde in ddH₂O oder TE-Puffer gelöst, mit einem ¾ Volumen Isopropanol versetzt und für 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde für an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser bzw. TE-Puffer resuspendiert.

7.14.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleinsäuren wurden nach geeigneter Verdünnung in ddH₂O mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Wert mit dem DNA-Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 50$) und dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend durch den Faktor 1000 geteilt. Daraus ergab sich die Konzentration der DNA in µg/µl.

7.14.3 Präparation von DNA

7.14.3.1 Präparation von genomischer DNA aus murinen Geweben mittels Qiagen DNeasy Tissue Kit

Die Isolation von genomischer DNA aus Mausgeweben wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits, nach Herstellerangaben durchgeführt.

7.14.3.2 Präparation von genomischer DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Präparierte Mausorgane wurden zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mörser zerkleinert. Zu Zellsuspensionen wurden sofort 10 ml Lysepuffer und Proteinase K (100 µg/ml) hinzugegeben. Das Lysat wurde für 3 h oder über Nacht bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lysat in ein 50 ml *Phase Lock Tube* überführt und ein Volumen Tris-equilibriertes Phenol hinzugegeben. Die Proben wurden vorsichtig invertiert und anschließend für 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Dabei kommt es zur Phasentrennung, bei der die untere, organische Phase durch ein Gelkissen von der oberen, wässrigen Phase getrennt wird. Anschließend wurde ein weiteres Volumen Phenol hinzugegeben und die Extraktion wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues *Phase Lock Tube* überführt und je ½ Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) und ½ Volumen Phenol hinzugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und bei 1500 g für 5 min zentrifugiert. Die Extraktion wurde zweimal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol in einem frischen *Phase Lock Tube* wiederholt. Nach der letzten Extraktion wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol abs. gefällt. Das Präzipitat wurde für 30 min bei 1500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in ddH₂O gelöst. Zur vollständigen Lösung wurde die DNA für 24 bis 48 Stunden bei 4°C inkubiert.

7.14.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Große Mengen Plasmid DNA wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits, geringe Mengen mit dem QIAprep Miniprep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA zur Entfernung von Endotoxinen erfolgte mit Hilfe des Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben. Alle verwendeten DNA-Vektorkonstrukte zur Transfektion von eukaryontischen Zellen wurden mit dieser Methode aufgereinigt.

7.14.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren, das die Amplifizierung definierter Nukleinsäure-Bereiche ermöglicht. Durch die Verwendung von geeigneten Puffern, Primern, Desoxynukleotiden und Reaktionsbedingungen kann die Taq-Polymerase ein DNA-Fragment exponentiell amplifizieren, das durch die Sequenz der beiden Primer begrenzt wird. Als DNA-Polymerase wurde entweder Phusion™ oder HotStarTaq verwendet. Die PCR-Reaktion bestand aus 35-40 Zyklen mit einer primerspezifischen Annealingtemperatur, die nach der Wallace-Regel wie folgt errechnet wurde: $T = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu synthetisierenden DNA und betrug annähernd 1 min/kb. Anschließend erfolgte eine Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.

Ein Reaktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen enthielt die folgenden Zusammensetzungen:

HotStar Taq	µl	Phusion™	µl
10x Puffer	5	5x Puffer GC	10
MgCl ₂ (3mM)	3	MgCl ₂	3
dNTPs (10 mM)	2	dNTPs	2
Primer 1 (10 pmol/µL)	2,5	Primer 1 (10 pmol/µL)	2,5
Primer 2 (10 pmol/µL)	2,5	Primer 2 (10 pmol/µL)	2,5
HotStar Taq (5U/µL)	0,2	Phusion-Pol.	0,2
DNA-Lösung	10	DNA-Lösung	10
ddH ₂ O	24,8	ddH ₂ O	19,8

7.14.5 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung von einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, wurden diese mit EB-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Je Oligonukleotid wurden 5 µg in das Reaktionsgefäß pipettiert und zur Auflösung von Sekundärstrukturen 5 min bei 90°C im Thermoblock inkubiert. Die Hybridisierung fand bei 37°C für 1 h im Wasserbad statt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Produkte bei -20°C gelagert.

7.14.6 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten und Plasmiden für Klonierungen verwendet. Ebenso dienten diagnostische Restriktionen zur Analyse und

Identifizierung von Klonierungsprodukten. Alle Restriktionen wurden mit Endonukleasen und Puffern von New England Biolabs (Frankfurt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Gewöhnlich wurde zur Restriktion das 10-fache Volumen der eingesetzten DNA-Menge in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die gewünschte Menge DNA, die entsprechende Menge Puffer und Restriktionsenzyme (5u/μg DNA) wurden zugegeben. Die Restriktionen wurden für 2 Stunden oder auch ü. N. unter Temperaturen nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die DNA des Restriktionsansatzes mit einem geeigneten Kit aufgereinigt (7.8).

7.14.7 Herstellung von *blunt-ends*

Überhängende 5'-Enden von doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren, wie sie z. B. bei Restriktionen entstehen, können mittels des N-terminalen Fragments der *E. coli* DNA Polymerase I (Klenow-Fragment), in Anwesenheit von dNTPs, zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt werden. Hierdurch ermöglicht man die Ligation von DNA-Fragmenten, die durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen inkompatible Enden erhalten haben. Des Weiteren können, durch Entfernen der 5'-Überhänge, Restriktionsschnittstellen entfernt und mögliche Religationen vermieden werden. Der geeigneten Menge DNA wurden 2 μl Restriktionspuffer, 1 μl 10 mM dNTPs, 1 μl Klenow-Fragment (5 u/μl) zugegeben und der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf 20μl aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug 15 min, bei 25°C. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Zugabe von 10 mM EDTA und thermale Deaktivierung bei 75°C für 20 min. Anschließend wurde die DNA des Reaktionsansatzes mit einem geeigneten Kit aufgereinigt.

7.14.8 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIP) ist eine Phosphomonoesterase, welche die Hydrolyse freier Phosphatgruppen von Nukleinsäuren katalysiert. Sie wurde zur Entfernung von 5'-Phosphaten linearisierter Vektoren vor einer Insertionsligation eingesetzt. Da die T4-DNA-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wird durch die Behandlung restringierter Vektor-DNA mit CIP eine Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligationsreaktion vermieden, wodurch der Anteil rekombinanter Plasmide steigt. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde in einem Endvolumen von 20μl durchgeführt. Die geeignete Menge DNA wurde in 17 μl ddH₂O aufgenommen, 2 μl 10x NEB3-Puffer und 1 μl

CIP (10 u/μl) zugegeben. Nach der Inkubation für 1 h bei 37°C wurde die DNA im Reaktionsansatz aufgereinigt.

7.14.9 DNA-Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit cohesiven oder glatten Enden, wurde Quick T4 DNA-Ligase verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurden 50 ng in TE-Puffer oder Wasser gelöste, restringierte und dephosphorylierte Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Das zu ligierende DNA-Fragment (*Insert*) wurde, der Plasmidlösung in einem 1-3-fachen molarem Überschuß an DNA-Enden zugegeben. Zur Berechnung der Mole an DNA-Enden wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{pmol ends} = \text{pmol DNA} \times (\text{number of cuts} \times 2 + 2)$$

Dem Ansatz wurden 2 μl Quick Ligase-Puffer, 1 μl Quick T4 DNA-Ligase (5u/μl) zugegeben und mit ddH₂O auf 20 μl Endvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurde der Ansatz zur Transformation von kompetenten Bakterien verwendet oder bei -20°C gelagert.

7.14.10 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mit Hilfe der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Kleinere DNA-Fragmente wandern dabei schneller durch die Gelmatrix als größere DNA-Fragmente. Zur Herstellung von Agarosegelen unterschiedlicher Konzentrationen, wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer unter Erwärmung gelöst. Für den anschließenden Nachweis der DNA im Agarosegel wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden 10 μl DNA-Lösung mit 2 μl 6x DNA-Ladepuffer versetzt. An die Elektrophoresekammer wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine Spannung von 10 Volt/cm Elektrodenabstand angelegt und das Agarosegel nach ca. 45 min unter UV-Licht fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und wird durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) zur Fluoreszenz angeregt. So können die aufgetrennten DNA-Fragmente als Banden im Gel sichtbar gemacht werden und mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard war eine Zuordnung der Bande zu einer bestimmten Größe möglich.

7.14.11 Radioaktiver Southern Blot

Beim Southern Blot handelt es sich um eine 1975 von Edwin Southern entwickelte Methode zum Nachweis einer bestimmten Nukleotidsequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (z.B. genomische DNA), ohne dass sämtliche Sequenzen des Gemisches bekannt sein müssen. Hierzu findet ein Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Trägermembran mittels Vakuum statt (*blotting*). Die übertragene DNA wird dann mit einer sequenzspezifischen, radioaktivmarkierten Sonde hybridisiert und über einen Röntgenfilm detektiert. Für einen genomischen Southern Blot wurden 20 µg genomische DNA mit entsprechenden Endonukleasen restringiert und anschließend über Nacht in einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert. Im Anschluss wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt, was zu einer Depurinierung der DNA führt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel anschließend für 30 min in 0,5 M NaOH, 0,5 M NaCl inkubiert. Nach 15 min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,5 M NaCl wurde die DNA im Vacuum Blotter bei einem Unterdruck von 3,5-4 mmHg für 90 min auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend mit 0,12 J UV-Licht mit der Membran quervernetzt. Die Membran wurde dann für mindestens eine Stunde bei 60°C in 30 ml ExpressHyb Buffer prähybridisiert. Während dessen wurde 20ng Southern Blot-Sonde mit Hilfe des Rediprime Labelling Systems radioaktiv markiert und nach Denaturierung der Sonde bei 95°C der Membran zugegeben und bei 60°C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur mit dem Waschpuffer 1 für 30 min gewaschen. Dabei wurde der Puffer mehrmals gewechselt. Im Anschluss wurde der Southern Blot für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Waschpuffer 2 gewaschen, wobei der Puffer einmal ausgetauscht wird. Danach erfolgte ein 10 minütiger Waschschrift mit Waschpuffer 2 bei 58°C im Wasserbad. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer Röntgenfilmkassette bei -80°C gelagert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte nach 1-2 Wochen.

7.14.11.1 Radioaktive Markierung der Southern-Blot-Sonde

Die 20ng der Southern Blot-Sonde wurde mit dem Rediprime II Random Prime Labelling System und radioaktiv markiertem dCTP nach Herstellerangaben markiert. Zur Entfernung der Sonde wurde der hybridisierte Southern Blot für 10 min in 90-100°C heißen 0,5%igen SDS-Lösung inkubiert und anschließend erneut prähybridisiert. Anschließend konnte die Membran erneut mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden.

7.15 Eukaryontische Zellkulturtechniken

7.15.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit Terralin Liquid desinfiziert. Es wurden neben Einwegverbrauchsmaterialien nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder Medien verwendet. Vor dem Beginn der Arbeit wurden alle Lösungen und Medien auf 37°C vorgewärmt. Eukaryontische Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert.

7.15.2 Passagieren von Zellen

Zellen, die in einer Kulturflasche eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten, wurden zunächst in PBS gewaschen und anschließend ca. 5 ml Trypsin (0,5%) zugegeben. Nach einer mehrminütigen Inkubation bei 37°C lösten sich die Zellen von der Kulturflasche ab. Durch vorsichtiges Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt und die Trypsinisierung durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend in geeignete Zellkulturgefäße überführt.

7.15.3 Lagerung von Zellen

Die Zellen wurden für die Lagerung in Stickstoff im jeweiligen Medium mit 10% DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran und ersetzt das Wasser innerhalb der Zelle. Es verhindert so, dass sich Eiskristalle beim Einfriervorgang bilden können, welche die Zellstruktur zerstören würden. Zum Einfrieren wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium resuspendiert, anschließend für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Einfriermedium resuspendiert und in geeignete Kryogefäße überführt. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der Temperatur von 1°C/Stunde ermöglicht, auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryogefäße im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurde, zur Entfernung des DMSO, die Zellen bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Nachdem das Einfriermedium verworfen wurde, konnten die Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturgefäße überführt werden.

7.15.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau seriell in log2 Stufen verdünnt. Eine geeignete Verdünnung wird auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt. Da jedes ausgezählte Quadrat eine Fläche von 0,04 mm² besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von 0,004 µl. Die ermittelte Zellzahl wird daher mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach der unten angegebenen Formel:

$$C = N \cdot V \cdot 10^4$$

C = Zellen pro ml

N = Mittelwert der gezählten Zellen

V = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor für 1 mm²

7.16 Arbeiten mit murinen embryonalen Stammzellen

7.16.1 Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit murinen ES Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit Terralin Liquid desinfiziert. Es wurden neben Einwegverbrauchsmaterialien nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder Medien verwendet. Vor dem Beginn der Arbeit wurden alle Lösungen und Medien auf 37°C vorgewärmt. ES Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. ES Zellen erhielten jeden Tag frisches ES Zell-Medium.

7.16.2 Passagieren von ES-Zellen

Zur Vermeidung der Differenzierung von ES Zellen und die Erhaltung des pluripotenten Status, wurden ES Zellen nie bis zur Erreichung der Konfluenz kultiviert. Zur Passage von ES Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und schließlich eine geeignete Menge Trypsin (0,25%) zugegeben. Nach einer

mehrminütigen Inkubation bei 37°C, wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und die Trypsinisierung durch Zugabe von ES Zell-Medium abgestoppt. Anschließend wurde eine geeignete Menge an ES Zellen in Kulturgefäße überführt.

7.16.3 Lagerung von ES Zellen

Das Einfrieren, Lagern und Auftauen von ES Zellen wurde unter den in 7.15.3 angegebenen Bedingungen unter Verwendung von ES Zell-Medium durchgeführt.

7.16.4 Präparation von primären embryonalen Fibroblasten (MEF)

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) liefern Nährstoffe und sind in der Lage die Pluripotenz von ES Zellen zu erhalten. Sie wurden als *monolayer* in sämtliche Zellkulturgefäße eingesät, bevor ES Zellen in diesen kultiviert werden konnten. MEFs wurden aus 13 Tage alten IFNAR^{-/-} Embryonen gewonnen. Hierzu wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und in 70% Ethanol desinfiziert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Einschnitt geöffnet und die Uterushörner freigelegt. Die Uterushörner wurden vom Tier abgelöst und in eine PBS-gefüllte Schale überführt. Anschließend wurden die Embryonen aus den Uterushörnern und den Fruchtblasen freipräpariert. Der Kopf und die Leber der Embryonen wurden entfernt, um bereits differenzierte Zellen und Erythrozyten zu eliminieren. Um eine möglichst einzellige Suspension zu erhalten, wurden die Embryonen in 0,25% Trypsin/EDTA aufgenommen, mit einer feinen Schere zerkleinert und mehrere Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Entfernung von zellulärem Debris wurde die Suspension 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in T175 Zellkulturflaschen überführt und MEF-Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert. Zum Einfrieren der MEFs wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm wurden die Zellen in MEF-Medium incl. 10% DMSO aufgenommen und auf 1 ml Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der Temperatur von 1°C/Stunde ermöglichte, auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

7.16.5 Irradiation von murinen embryonalen Fibroblasten

Zur mitotischen Inaktivierung von MEFs wurden diese zunächst in T175-Kulturflaschen stark expandiert. Gewöhnlicherweise wurden zur Irradiation mindestens 20 T175-Kulturflaschen verwendet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend

mit 0,25% Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in MEF-Medium in 50 ml Polyesterol-Röhrchen überführt. Die Irradiation erfolgt in einer Gammastrahlen-Quelle mit 3000 rad. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm pelletiert, in MEF-Medium incl. 10% DMSO aufgenommen und auf 1 ml Cryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der Temperatur von 1°C/Stunde ermöglichte, auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Alternativ konnten bestrahlte MEFs direkt in Zellkulturflaschen mit MEF-Medium überführt werden.

7.16.6 Elektroporation von ES Zellen

ES Zellen wurden mit dem linearisierten Targeting-Konstrukt mittels Elektroporation transfiziert. Pro Elektroporationsansatz wurde ca. 1×10^6 ES Zellen verwendet. Zuerst wurden ES Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 0,25% Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 g, 5 min, RT) pelletiert und anschließend in 700 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension und 10 µg des linearisierten Targeting-Vektors wurden in eine Elektroporations-Küvette gegeben und gemischt. Die Elektroporation fand bei 240 V, 500 µF und 125 Ω statt. Die Pulszeiten betrugen dabei 6-8 ms. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wird die Zellsuspension in ES Zell-Medium aufgenommen und je 10 ml der ES Zell-Suspension auf Zellkulturschalen mit einem *monolayer* von MEFs ausgesät. Nach 24 h wurde dem ES Zell-Medium Geneticin® (G418) (400µg/ml) als positiver Selektionsmarker zugesetzt. 48 h nach der Elektroporation wurde zusätzlich der negative Selektionsmarker Cymevene® (0,54µg/ml) zugegeben. Nach 10-12 Tagen wurden die überlebenden ES Zell-Klone zur weiteren Analyse gepickt und vereinzelt weiter kultiviert. Dazu wurde das ES Zell-Medium entfernt und 10 ml PBS dazugegeben. Unter dem Mikroskop wurde ein entsprechender Klon lokalisiert, mit Hilfe einer 10 µl Pipette aufgezogen und in ein 96-well mit 25 µl PBS überführt. Durch Hinzufügen von 50 µl Trypsin/well und Inkubation für 3 min bei 37°C wurden die Zellen vereinzelt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ES Zell-Medium gestoppt und die ES Zellen in ein MEF-*monolayer* 96-well überführt und weiter kultiviert.

7.16.7 Transiente Expression von Cre-Rekombinase

Zur transienten *in vitro*-Expression der Cre-Rekombinase, wurden gepickte ES Zell-Klone mit dem Vektor pGK-puroCre transfiziert. Da die Neomycin-Kassette des Targeting-Konstrukts von loxP-sites flankiert wird, war es möglich diese durch transiente Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom zu deletieren. Hierzu wurde 1/3 eines 6-wells von

positiven ES Zell-Klonen mit 10 µg des zirkulären Vektors elektroporiert und anschließend auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach 1 Tag wurde dem Kulturmedium für 24 Stunden 1,25 µg Puromycin/ml zugegeben. Diese 24 Stunden waren ausreichend um ES Zellen zu selektionieren, die erfolgreich mit pGK-puroCre transfiziert wurden. Nach 10 Tagen Kultivierung wurden ES Zell-Klone gepickt. Je 50 % eines gepickten ES Zell-Klons wurden auf MEFs ausgesät und in ES Zell-Medium expandiert. Zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Kassette wurde die andere Hälfte jedes gepickten Klons in G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Nach ca. 5 Tagen in G418-haltigem Selektionsmedium starben Neomycin-sensitive ES Zell-Klone, was auf die Deletion der Neomycin-Kassette hinwies. Der parallel dazu ohne Selektionmedium kultivierte Teil dieser ES Zell-Klone wurde anschließend weiter expandiert. Der Nachweis der Deletion der Neomycin-Kassette aus dem Genom der positiven ES Zell-Klone, wurde mit spezifischen PCRs kontrolliert.

7.16.8 Präparation von ES-Zellen zur Blastozysten-Injektion

Um positive ES Zell-Klone für die Blastozysten-Injektion vorzubereiten, wurde zunächst ein Aliquot ES-Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale eingesät. Bei Erreichen der für ES Zellen zulässigen Konfluenz, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin (0,25%) gelöst und zu 1/3 bzw. 2/3 in zwei neue 10 cm Zellkulturschalen eingesät. Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz, wurde den Zellen 2 h vor der Trypsinierung frisches ES Zell-Medium zugeführt. Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin (0,25%) gelöst, die Reaktion mit ES-Zell-Medium gestoppt und die Zellen anschließend mit einer Pasteur-Pipette sorgfältig vereinzelt. Danach wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min pelletiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Zur Eliminierung von MEFs, welche die Blastozysten-Injektion stören würden, wurden die Zellen 2x für 30 min in Gelatine-beschichtete 10 cm Zellkulturschale überführt. Während dieser Zeit adherierten MEFs, während ES Zellen im Medium verblieben. Die im Überstand verbleibenden ES Zellen wurden erneut für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert und in 3 ml 4°C kaltem MEF-Medium, welches 20mM HEPES enthielt, resuspendiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden bis zur Mikroinjektion auf Eis (max. 5h) gelagert. Die Mikroinjektionen wurden am *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), Monterotondo Scalo, Italien, in der zentralen Versuchtiereinrichtung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz oder am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig durchgeführt.

7.17 Mikrobiologische Techniken

7.17.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt auf LB-Agarplatten oder als Zellsuspension im LB-Flüssigmedium bei 37°C und 220 upm auf einem Schüttler im Brutraum. Die dauerhafte Lagerung von Bakterien erfolgte als Glycerinstock bei -80°C. Zur Herstellung eines Glycerinstocks wurden 400µl einer LB-Bakteriensuspension mit 100µl sterilem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

7.17.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden ultrakompetente *E. coli*s vom Stamm XL2-blue verwendet. Das Auftauen der Bakterien erfolgt auf Eis. Pro Transformationsansatz wurden 60µl Bakteriensuspension verwendet, denen 2µl β-Mercaptoethanol zugegeben wurde. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 0,1-50ng DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes mit den Bakterien vermischt erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA wurden die Bakterien für 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, danach sofort für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend 940µl vorgewärmtes (42°C) NZY⁺-Medium zugegeben. Gewöhnlich wurden 50µl der transformierten Bakterien auf LB-Amp-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden gewachsene Kolonien isoliert und in Flüssigkultur vermehrt. Nach Präparation der Plasmid-DNA, wurde diese durch Restriktion oder Southern Blot verifiziert.

7.17.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit Hilfe von Qiagen Plasmid-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Das grundlegende Prinzip dieser Methode beruht auf dem Binden von DNA an Anionen-Austausch-Säulen. So können alle zellulären Komponenten effektiv von der Plasmid-DNA getrennt werden. Für die Extraktion von geringen Mengen an DNA (Miniprep) wurden über Nacht 5 ml Kulturen in LB-Amp-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Am nächsten Tag konnten die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min sedimentiert werden. Das Pellet wurde, mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Lösungen alkalisch lysiert. Die chromosomale DNA und zelluläre Fragmente konnten durch eine weitere Zentrifugation bei 13.000 g für 10 min von der Plasmid-DNA getrennt werden. Anschließend wurde der Überstand auf eine Anionen-Austausch-Säule gegeben und weitere Aufreinigungsschritte nach Angaben der Hersteller

durchgeführt. Für die Aufreinigung von größeren Mengen an Plasmid-DNA (Maxiprep) werden 200 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Nach Anzucht werden die Bakterien bei 4200 rpm und 4°C für 15 min pelletiert, anschließend lysiert und schließlich die chromosomale DNA und Zelltrümmer entfernt. Das gefilterte Lysat wird über eine Anionen-Austausch-Säule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Wurden Plasmide zur Transfektion von eukaryontischen Zellen verwendet konnten bakterielle Endotoxine durch Verwendung des EndoFree-Kits eliminiert werden. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

7.18 Tierexperimentelle Techniken

Alle Mausexperimente wurden entsprechend der gesetzlichen Leitlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt.

7.18.1 Maushaltung

Alle Mauslinien wurden unter SPF-Bedingung im S1 Bereich der zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Institut gezüchtet und gehalten. Zu Beginn eines Experiments wurden die Mäuse in den experimentellen Mausraum (S2) transferiert, wobei die Mäuse in einzelbelüfteten Käfigen in gleichgeschlechtlichen Gruppen von bis zu 5 Tieren und nur zu Zuchtzwecken in gegenschlechtliche Gruppen gehalten wurden. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse wurden im Paul-Ehrlich-Institut gezüchtet. C57BL/6 Mäuse wurden über die Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln bezogen. Die verwendeten Genotypen wurden über PCR verifiziert.

7.18.2 Mausnarkose

7.18.2.1 Kurzzeitinhalationsnarkose

Zur Kurzzeitinhalationsnarkose wurde 1-2 ml Isofluran in ein Glas mit Deckel gegeben und mit etwas Zellstoff überdeckt. Die Maus wurde in das Glas gegeben und bis zur Narkose beobachtet. Nachdem Herausnehmen der Mäuse blieben sie noch etwa 30 Sekunden in Narkose.

7.18.2.2 Langzeitnarkose

Den Mäusen wurden pro 10 g Körpergewicht 100 µl Ketamin/Rompun *i.p.* gespritzt. Nach einer Inkubation von etwa 15 Minuten lagen die Mäuse in Vollnarkose (Überprüfung des Zwischenzehenreflexes).

7.18.3 Maustötung

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

7.18.4 Retroorbitale Blutentnahme

Die Mäuse wurden mittels Isofluran betäubt. Einer Pasteur-Pipette wurde in den Augenwinkel, am Augapfel vorbei eingeführt und der Venenkomplex im Innern der Augenhöhle eine Läsion gesetzt. Pro Blutentnahme konnten so ca. 100 bis 200 µl Blut gewonnen werden.

7.18.5 Virusinfektion von Mäusen

7.18.5.1 Intranasale Infektion

Zur intranasalen Infektion wurden Mäuse zunächst Langzeit-narkotisiert. Das in PBS verdünnte Virus konnte anschließend, in einem Gesamtvolumen von 10 µl, in die Nase pipettiert werden.

7.18.5.2 Intravenöse Infektion

Um eine intravenöse Injektion in die Schwanzvene zu erleichtern, wurden die Mäuse ca. 10 min unter Rotlicht aufgewärmt. Die Menge des zu injizierenden Virus wurde in 200 µl PBS 0,1% BSA gelöst. Die Maus wurde in einer Röhre fixiert, die den Schwanz leicht zugänglich machte. Der Spritzeninhalt wurde anschließend in die Schwanzvene injiziert.

7.18.6 Präparation von Peritonealzellen

Um Einblutung in das Peritoneum zu verhindern, wurden Versuchsmäuse bei der Peritonealzell-Präparation nicht durch zervikale Dislokation, sondern durch CO₂-Inhalation getötet. Nach dem Töten wurden alle Mäuse in einem 70 %igen Ethanolbad desinfiziert. Ventral und kaudal der Rippenbögen wurde ein V-Schnitt zum Öffnen der Haut gesetzt und anschließend das Fell weit aufgezo-gen. Mit einer Injektionsspritze injiziert man 5 – 10 ml kaltes PBS in die Bauchhöhle, um peritoneale Zellen durch Schwenken der Maus zu lösen. Dicht unter der Bauchdecke, ohne Organe zu verletzen wird die Zellsuspension vorsichtig mit der Injektionsspritze wieder aufgezo-gen. Peritonealzellen wurden danach auf Eis gehalten und vor der Weiterverarbeitung gut resuspendiert.

7.19 Immunologische und virologische Techniken

7.19.1 Anzucht von VSV

Geeignete Mengen BHK Zellen wurden in Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wurde entfernt und VSV mit einer MOI 0,1 in 3 ml MEM mit 2% FCS zu den Flaschen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 27 ml Medium hinzugegeben und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 300 x g für 6 Minuten entfernt.

7.19.2 Bestimmung von Virustitern (Plaque-Assay)

Zunächst wurden in 6-Well Flachboden-Zellkulturplatten je 3 ml einer Verozellsuspension (2×10^5 Zellen/ml in Medium) eingesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung von Virustitern aus Organen wurden diese in 1 ml Medium mit Hilfe des FastPrep-Homogenisators homogenisiert und das Homogenat in seriellen 1:10 Schritten verdünnt. Je 1 ml der Verdünnungen wurde auf den konfluenten Zellrasen gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Medium vorsichtig mit 1%iger Methylcellulose überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolett überschichtet. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Farblösung mit Leitungswasser gewaschen und die Platten luftgetrocknet.

Die Plaques werden ausgezählt und der Virustiter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$pfu / ml = N \cdot V^{-1}$$

N = Anzahl der Plaques

V = Verdünnung

7.19.3 Bestimmung von VSV-neutralisierenden Antikörpertitern

Mit Hilfe des VSV-Neutralisationstest wurden VSV-neutralisierende Antikörper-Titer aus Maus-Seren bestimmt. Dazu wurden zunächst in 96-well Flachboden-Zellkulturplatten je 100 µl einer Verozellsuspension (2×10^5 Zellen/ml in Medium) gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zum Nachweis von IgG wurden 10 µl Serum mit 10 µl 280mM β-

Mercaptoethanol versetzt, was vorhandene IgM-Moleküle durch Reduktion zerstört. Die Seren wurden mit Medium 1:20 bzw. 1:40 vorverdünnt und für 30 Minuten bei 56°C inkubiert, um Komponenten des Komplementsystems zu inaktivieren. Zu 100 µl der verdünnten Seren wurden je 100 µl VSV in einer Konzentration von 10^3 pfu/ml gegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Von den ausgesäten Verozellen wurde das Medium entfernt und je 100 µl der Virus-Serum-Mischung zugegeben. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Medium mit 1%iger Methylcellulose überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolett überschichtet. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Farblösung mit Leitungswasser gewaschen, die Platten luftgetrocknet und Plaques ausgezählt. Die Serumverdünnung, welche die Menge der Virusplaques um 50% reduzierte, wurde als Antikörpertiter aufgezeichnet (Charan, S. und Zinkernagel, R. M., 1986).

7.19.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA erlaubt einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen, Seren oder Gewebehomogenaten. Die Methode bedient sich eines Enzyms als Marker, wobei die Proteinkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden kann. Für sämtliche Experimente wurde ein *Sandwich*-Immunoassay verwendet. Hierbei sind spezifische, monoklonale Antikörper bereits auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Das zu bestimmende Protein wird zunächst durch die Antikörper auf der Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Wegwaschen der ungebundenen Proteine, wird ein spezifischer Enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben, der wiederum an das gebundene Protein auf der Platte bindet. Bei dem Enzym handelte es sich in den hier angewendeten Tests um die Meerrettich-Peroxidase (HRP). Das ungebundene Enzym-Reagenz wurde durch verschiedene Waschschrte entfernt und eine Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung zugesetzt. Durch Umwandlung des TMB durch die HRP wird ein blaufärbtes Produkt gebildet, das sich nach Zugabe einer Stop-Lösung gelb verfärbt. An einem *ELISA-Reader* konnte anschließend die Absorption der Lösung bestimmt werden. Die Farbintensität verhält sich hierbei proportional zur gebundenen Proteinmenge. Über eine Standardreihe, die in jedem Test mitgeführt wurde, konnten die genauen Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines *ELISA-Reader* von Tecan und wurde mit dem Programm Tecan XRead Plus ausgewertet. Die genauen Arbeitsschritte wurden gemäß dem Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt.

7.19.5 Durchflusszytometrie

7.19.5.1 Analyse der IFNAR-Expression auf murinen Peritonealzellen

1×10^6 präparierte Peritonealzellen (7.18.6) wurden in 20 μ l PBS aufgenommen und der Fc-Block für 15 min bei 4°C durchgeführt. 0,25 μ l des IFNAR-spezifischen Antikörpers MAR1 (1:4) wurde für 20 min bei 4° in FACS-Puffer mit den Zellen inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 1 μ l Strepavidin und den jeweiligen Zelltyp-spezifischen Antikörpern (7.6), erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert (100 μ l PFA+200 μ l FACS-Puffer). Die Proben wurden an einem LSRII von Becton Dickinson analysiert und mit dem BD FACS Diva-Programm ausgewertet.

7.19.5.2 Berechnung der spezifischen IFNAR-Expression

Die Deletionseffizienz einer konditional deletierenden Mauslinie, ergibt sich aus der verbleibenden Expression des zu deletierenden Gens, im Vergleich zum WT (C57BL/6). Als Positivkontrolle einer Deletion gelten komplett deltierende Tiere, die durch homologe Rekombination das entsprechende Gen vollständig verloren haben. Die Deletionseffizienz der konditionalen IFNAR-Deletionslinien wurde mittels zytometrischer Analyse mit einem monoklonalen anti-murinen IFNAR1 Antikörper (MAR1) ermittelt. Mit FACS-Diva wurden die Median-Werte der Fluoreszenzintensität (MdFI) festgestellt. Die spezifische IFNAR-Expression (X) wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

A = MAR1-MdFI der untersuchten Maus

B = MAR1-MdFI der IFNAR^{-/-} Maus

C = MAR1-MdFI der C57BL/6 Maus

Gemäß dieser Formel wird die IFNAR-Expression von IFNAR^{-/-} Mäusen immer als 0 % und die von C57BL/6 Mäusen als 100 % festgelegt.

8 Ergebnisse

8.1 Entwicklung eines neuen Maus-Modells zur Analyse der PrP-spezifischen Immuntoleranz

8.1.1 Targeting-Strategie

Genetisch veränderte Mäuse mit einer definierten Mutation in einem spezifischen Genort werden mittels zielgerichteten Mutagenese (*Gene-Targeting*) hergestellt. Die zielgerichtete Mutagenese basiert auf dem Prinzip der homologen Rekombination und wird in murinen embryonalen Stammzellen (ES Zellen) durchgeführt. Oftmals werden durch homologe Rekombination Resistenzmarker, wie das Neomycin-Gen ins Genom eingebracht, die nach der Identifikation von positiven ES Zell-Klonen deletiert werden müssen. Daran anschließend werden ES Zell-Klone in Blastocysten mikroinjiziert und in pseudo-schwangere Weibchen transferiert.

Um in ES Zellen eine homologe Rekombination herbei zu führen, bedarf es der Herstellung eines spezifischen Targeting-Vektors. Der Targeting-Vektor besteht üblicherweise aus einem Genabschnitt, der die gewünschte Mutation enthält, zwei flankierenden homologen Armen, die den Targeting-Vektor in den spezifischen Genort dirigieren können und diverser Selektionskassetten zur Anreicherung homolog rekombinierter ES-Zellen.

In dieser Arbeit wurde zur Mutation des schwere Kette Immunglobulinlokus der Vektor $\text{piV}_\text{HL2neo}^r$ verwendet, der bereits erfolgreich für mehrere Ig-Targetings eingesetzt wurde (Taki, S. *et al.*, 1993; Sonoda, E. *et al.*, 1997; Hangartner, L. *et al.*, 2003). Er enthält zwei, dem schwere Kette Immunglobulinlokus homologe DNA-Abschnitte unterschiedlicher Größe. Der lange homologe Arm (lha) umfasst ca. 8,5 kb und entspricht der *Intron*-Sequenz zwischen dem letzten (DQ52) und dem vorletzten (Dsp2.8) D-Element. Der kurze homologe Arm (sha) des Targeting-Vektors umfasst ca. 0,9 kb und entspricht dem *Intron* zwischen dem letzten J-Element und dem μ -*Intron-Enhancer*. Somit ist es möglich, das DQ52-Element und alle J_H-Elemente durch homologe Rekombination zu ersetzen.

Zur Positiv-Selektion von ES Zell-Klonen enthält der Vektor $\text{piV}_\text{HL2neo}^r$ eine Neomycin-Kassette. Diese verleiht ES Zellen, die das Targeting-Konstrukt stabil integrieren, eine dauerhafte Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418), welches die Proteinbiosynthese hauptsächlich in eukaryotischen Zellen hemmt. Geneticin kann somit als positiver Selektionsmarker für stabil transfizierte ES Zell-Klone benutzt werden. Die

Neomycin-Kassette ist von zwei loxP-Sequenzen flankiert (gefloxt). Die 34 bp langen loxP-Sequenzen (*locus of crossover (x) in P1*) bestehen aus zwei 13 bp langen *inverted Repeats*, die von einer 8 bp langen *Spacer*-Region getrennt werden. Die *Spacer*-Region besitzt eine nicht-palindromische Sequenz und bestimmt die Orientierung der gesamten loxP-site. Das Enzym Cre-Rekombinase (*causes recombination*) des Bakteriophagen P1 erkennt diese Sequenzen und vermittelt über ein Holliday-Intermediat, eine loxP-site-spezifische Rekombination.

Wenn zwei loxP-sites auf einem linearen DNA-Molekül in gleicher Orientierung vorliegen, führt eine Cre-vermittelte intramolekulare Rekombination zur Deletion der loxP-flankierten Region. Dabei verbleibt eine der loxP-sites im Genom. Liegen zwei loxP-sites in entgegengesetzter Orientierung vor, wird die loxP-flankierte Region durch Cre-Rekombinase invertiert. Da die Neomycin-Kassette im Vektor piV_HL2neo^r von zwei, in gleicher Orientierung liegender loxP-sites flankiert wird, kann sie durch Cre-Expression aus dem Genom deletiert werden.

Als weiteren Selektionsmarker beinhaltet der Vektor piV_HL2neo^r die codierende Region der Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK). Die HSV-TK-Kassette liegt am 5'-Ende des langen homologen Arms und wird bei homologer Rekombination zumeist nicht ins Genom integriert. Bei zufälliger Integration des Targeting-Konstrukts wird die HSV-TK-Kassette mit großer Wahrscheinlichkeit nicht deletiert. Substanzen wie Gancyclovir oder Cymevene werden von der HSV-Thymidinkinase in toxische Produkte umgewandelt, sodass durch Zugabe dieser Substanzen in das Zellkulturmedium gegen zufällige Integranden selektioniert werden kann.

Die hier verwendete Targeting-Strategie basiert auf der Ersetzung aller endogenen J_H-Elemente und des letzten D-Elements durch ein Kassette, welche zwei zueinander invers orientierte, rearrangierte V_H-Regionen enthält. Eine V_H-Region befindet sich dabei in der Nähe des genomischen *intron-enhancers* und stammt aus dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) spezifischen Antikörper KL25 (V_HKL25). In 5'-Richtung der V_HKL25-Region befindet sich invers orientiert die PrP-spezifische variable Region der schweren Kette des Antikörpers 6H4 (V_H6H4). Diese Kassette soll durch loxP-sites, die in entgegengesetzter Orientierung vorliegen, flankiert werden (Abb. 5).

Mäuse, die aus derart veränderten ES-Zellen abstammen, tragen B Zellen, die zunächst die schwere Kette des anti-LCMV-spezifischen Antikörpers exprimieren. Nach Induktion der Cre-Expression kann die loxP-flankierte Kassette invertiert werden. Dies führt zur Expression der schweren Kette des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4.

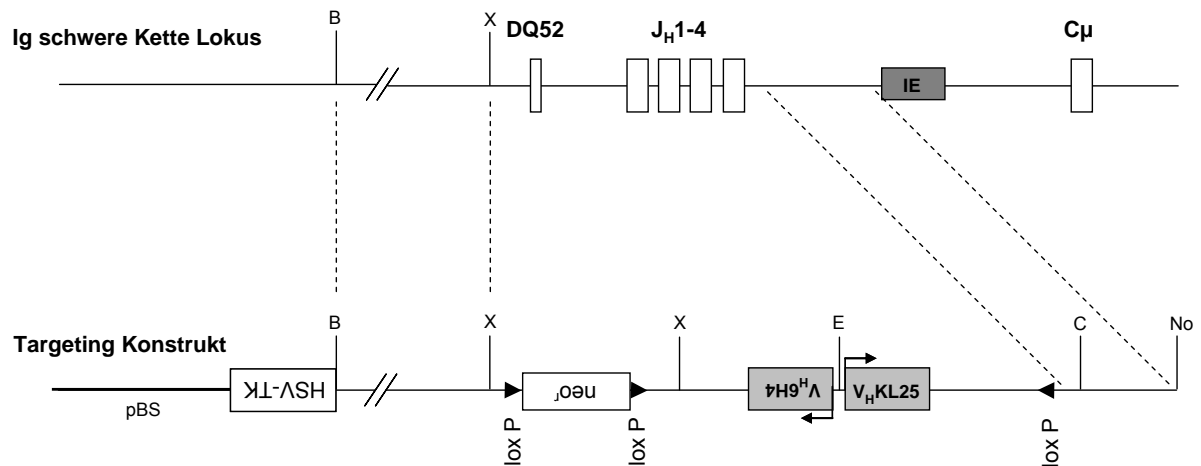


Abb. 5 Targeting Strategie für die Herstellung der V_HKL25-6H4-flox-Maus. Der genomische IgH-Lokus und der Targeting-Vektor pV_HKL25-6H4-flox sind schematisch dargestellt. Der Targeting-Vektor enthält die rearrangierte V_H-Region des Hybridoms KL25 und dazu invers orientiert die rearrangierte V_H-Region des Hybridoms 6H4. Eine zusätzliche loxP-site wurde 3' der integrierten V_H-Regionen in das Targeting Konstrukt kloniert. Zur Selektion von positiven ES-Zell-Klonen enthält das Konstrukt eine gefloxe Neomycin-Resistenz-Kassette und 5' des langen homologen Arms eine HSV-TK-Kassette. Durch homologe Rekombination ersetzt das Targeting-Konstrukt die endogenen J_H-Elemente und das letzte D-Elemente DQ52. IE, *intron enhancer*, pBS, *pBluescript*IIISK⁺, Restriktionsenzym-Schnittstellen (B, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; No, *Not*I; X, *Xho*I).

Die Abb. 6 zeigt eine schematische Übersicht der Klonierungsstrategie des Targeting-Vektors pV_HKL25-6H4-flox. Details zur Klonierung werden in den nachfolgenden Abschnitten erläutert.

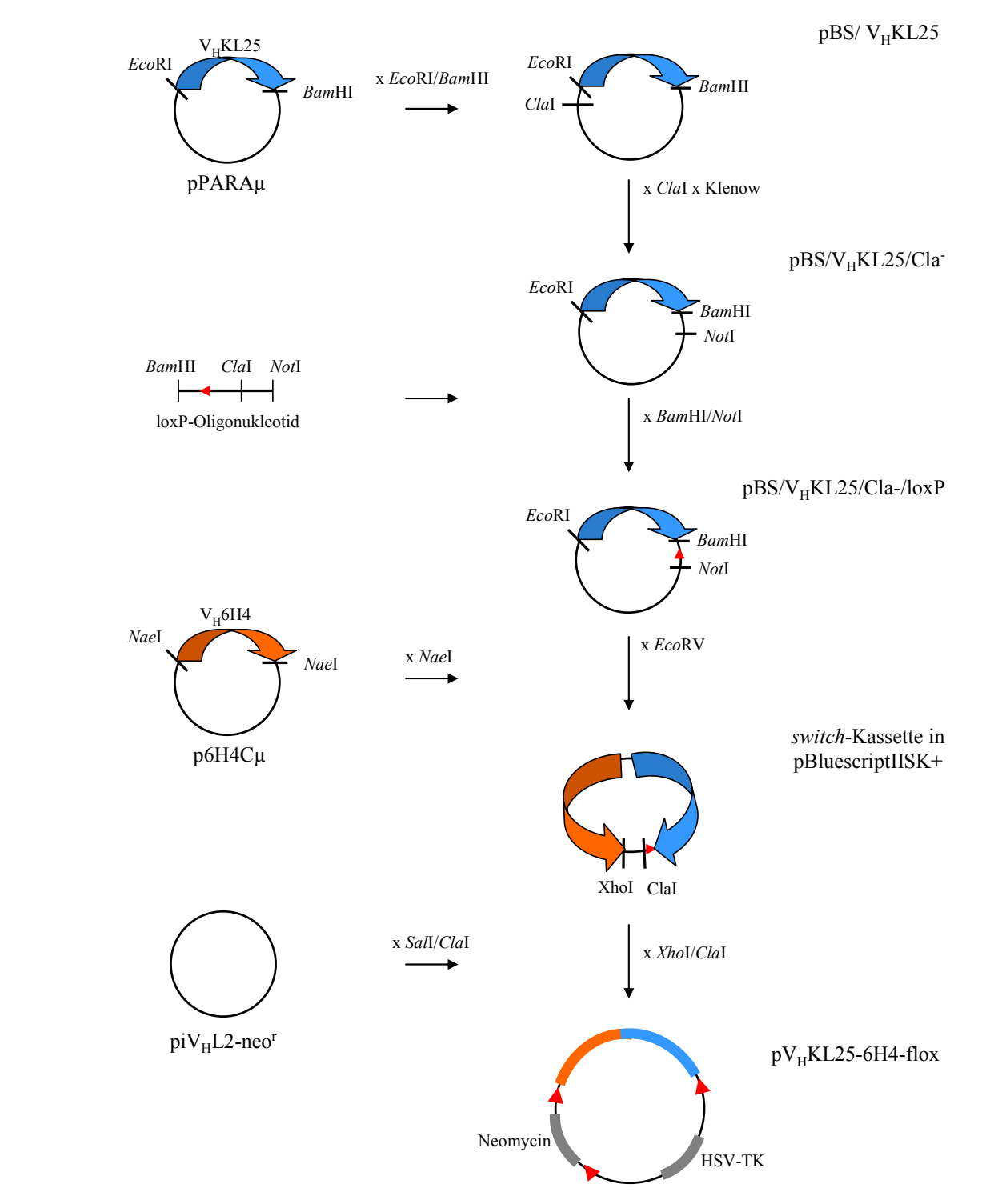


Abb. 6 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Targeting-Vektors pV_HKL25-6H4-flox

8.1.2.1 Klonierung von V_H KL25 in *pBluescriptIISK+*

Der Vektor *pPARA μ* wurde bereits zur Herstellung der transgenen Maus H25 verwendet (Seiler, P. *et al.*, 1997). Transgene H25 Mäuse exprimieren eine Immunglobulin M (IgM) schwere Kette des LCMV-neutralisierenden Ak KL25. Durch Restriktion von *pPARA μ* mit *EcoRI* und *BamHI* konnte ein 2,4 kb großes Fragment isoliert werden, welches die rearrangierte V_H -Region des monoklonalen Antikörpers KL25 und dessen autologen Promoter beinhaltet (Abb. 7A). Das 2,4 kb große V_H KL25-Fragment wurde anschließend in den *EcoRI/BamHI* restringierten Vektor *pBluescriptIISK+* (Abb. 7B) umklontiert. Diese Zwischenklonierung wurde mit analytischen Restriktionsverdauen verifiziert (Abb. 7C). Die Integration des 2,4 kb V_H KL25-Fragments in *pBluescriptIISK+* konnte durch *Sall* Restriktion nachgewiesen werden. *Sall*-Restriktion führte zu einem ~2,1 kb großen V_H KL25-Fragment und einem ~3 kb großen Fragment welches hauptsächlich den Vektor-*backbone* enthält.

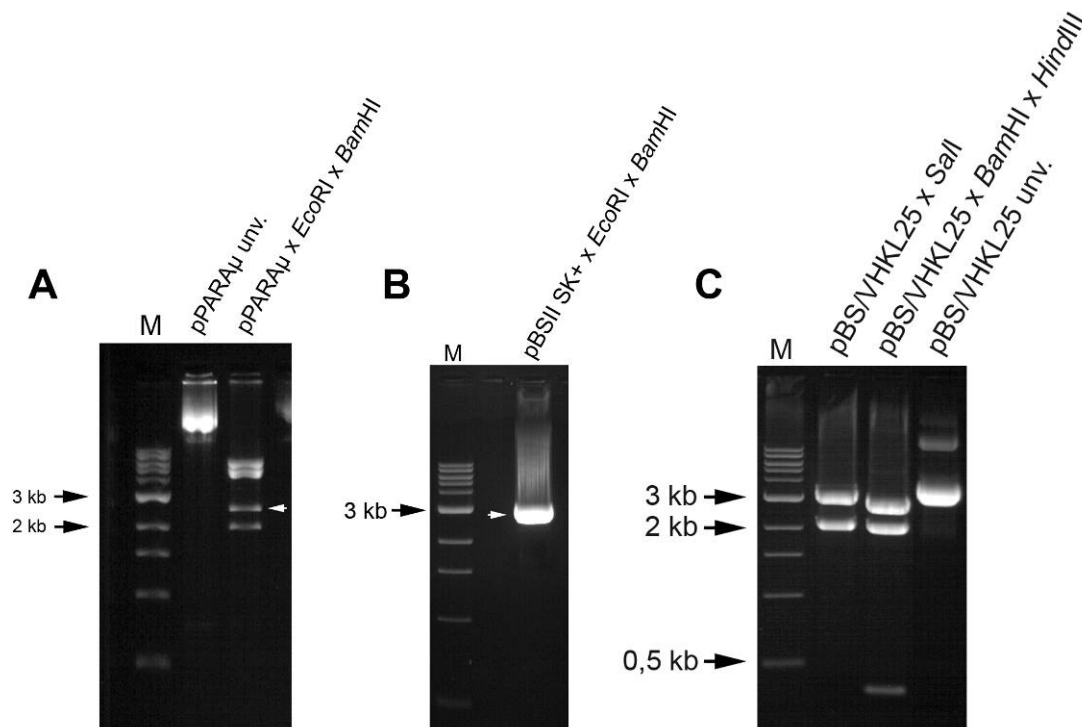


Abb. 7 Klonierung von V_H KL25 in *pBluescriptIISK+*. Je 1 μ g DNA wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen für 2 h geschnitten und anschließend je 300 ng der Restriktionsansätze auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. M, Marker.

Durch eine Restriktion mit *BamHI/HindIII* wurden Fragmente in den Größen 400 bp, 2,1 kb und 2,6 kb erwartet. Der leere Vektor *pBluescriptIISK+* würde durch diese Restriktionen lediglich linearisiert, was zu einem ~2,9 kb großen Fragment führen würde. Die Nukleotidsequenz des V_H KL25-Fragments und dessen Orientierung im Vektor

pBluescriptIIISK⁺ wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung verifiziert (siehe Anhang, A).

8.1.2.2 Zerstörung der *Cla*I-Restriktionsschnittstelle

Zur Fortführung der Klonierungsstrategie war es notwendig, die *Cla*I-Restriktionsschnittstelle im entstandenen Konstrukt pBS/V_HKL25 zu zerstören. Hierzu wurde das Konstrukt pBS/V_HKL25 zunächst mit *Cla*I linearisiert. Der linearisierte Vektor wurde dann mit DNA-Polymerase I, großes (Klenow) Fragment inkubiert, sodass es zur Ausbildung von glatten Enden (*blunt-ends*) kam und somit zur Zerstörung der *Cla*I-Erkennungssequenz. Eine anschließende Inkubation mit T4 DNA Ligase führte zu einer Rezirkularisierung des Vektors. Das Plasmid pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻ wurde in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Nach Extraktion der Plasmid-DNA wurde eine analytische *Cla*I-Restriktion durchgeführt. *Cla*I-deletierte Plasmid-DNA des Konstrukts pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻ lässt sich durch *Cla*I nicht mehr linearisieren und verhält sich im Agarosegel wie unrestringierter Vektor (Abb. 8). Bei nicht erfolgreicher *Cla*I-Deletion wird das Konstrukt linearisiert und ein ~5 kb großes Fragment lässt sich nach Auftrennung im Agarosegel nachweisen (Abb. 8, Klon 4). Die Deletion der *Cla*I-Restriktionsschnittstelle im Konstrukt pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻ wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung verifiziert (siehe Anhang, C).

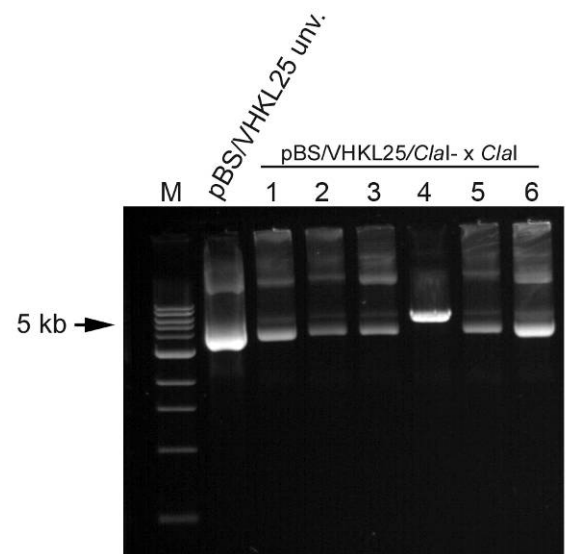
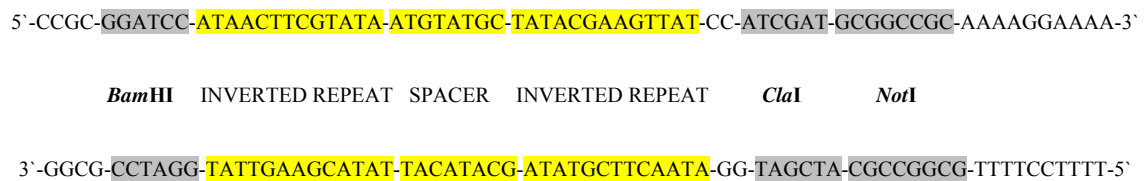


Abb. 8 Analytische Restriktion von pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻-Vektorkonstrukten verschiedener bakterieller Klone mit *Cla*I. *Cla*I-deletierte Plasmid-DNA trennt sich ungeschnitten im Agarosegel auf (Klone 1-3,5,6). Nicht *Cla*I deletierte Plasmid-DNA wurde linearisiert und ließ sich als ~ 5,4 kb großes Fragment nachweisen (Klon 4).

8.1.2.3 Klonierung einer *loxP*-site in pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻

Zur Klonierung einer zusätzlichen *loxP*-site in pBS/V_HKL25/*Cla*I⁻ wurden zunächst 2 zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide synthetisiert. Neben der DNA-Sequenz der *loxP*-site beinhalten die Oligonukleotide in 5'-Richtung die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI und in 3'-Richtung die Erkennungssequenzen für *Cla*I und NotI (Abb. 9). Die Oligonukleotide wurden in äquimolaren Mengen in EB-Puffer hybridisiert,

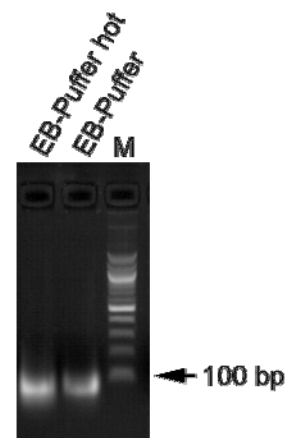
sodass doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Größe von 70 bp entstanden. Zur Vorbereitung der Klonierung in pBS/VHKL25/ClaI- war eine Restriktion der hybridisierten Oligonukleotide mit BamHI und NotI notwendig (Abb. 10).



← Orientierung der loxP-site

Abb. 9 DNA-Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide. Zur Herstellung einer zusätzlichen loxP-site wurden beide Oligonukleotide hybridisiert und anschließend in den Targeting-Vektor kloniert. Gelb, DNA-Sequenz der loxP-site. Grau, für Klonierungen wichtige Restriktionsschnittstellen.

Abb. 10 Hybridisierung von Oligonukleotiden zur Herstellung einer zusätzlichen loxP-site. Doppelsträngige DNA-Fragmente mit der erwarteten Größe von 70 bp ließen sich im Agarosegel nachweisen. Die Hybridisierung wurde in erhitztem EB-Puffer oder bei RT erfolgreich durchgeführt.



Das Vektorkonstrukt pBS/VHKL25/ClaI- wurde ebenfalls mit BamHI/NotI restringiert und eine Dephosphorylierung mit alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIP) durchgeführt. Anschließend wurde das 70 bp große BamHI/NotI restringierte DNA-Fragment in den Vektor pBS/VHKL25/ClaI- kloniert. Die Klonierung der zusätzlichen loxP-site wurde durch analytische Restriktionen mit ClaI verifiziert. Das Vektorkonstrukt pBS/VHKL25/ClaI- enthält keine ClaI Restriktionsschnittstelle mehr. Jedoch enthält das einklonierte loxP-DNA-Fragment die Erkennungssequenz für ClaI. Somit muss sich das Konstrukt pBS/VHKL25/ClaI-/loxP durch ClaI linearisieren lassen, was zu einem Fragment in der erwarteten Größe von ~ 5,5 kb führt (Abb. 11A). Eine weitere analytische Restriktion von pBS/VHKL25/ClaI-/loxP mit EcoRI/ClaI führte wie erwartet zu einem ~3 kb Fragment, welches hauptsächlich den Vektor-backbone von pBluescriptIISK+ enthält und einem 2,5 kb großen Fragment bestehend aus der VHKL25-Region und der einklonierten loxP-site (Abb. 11B). Das Vorhandensein der zusätzlichen loxP-site in pBS/V_HKL25/ClaI-/loxP wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt (siehe Anhang, B).

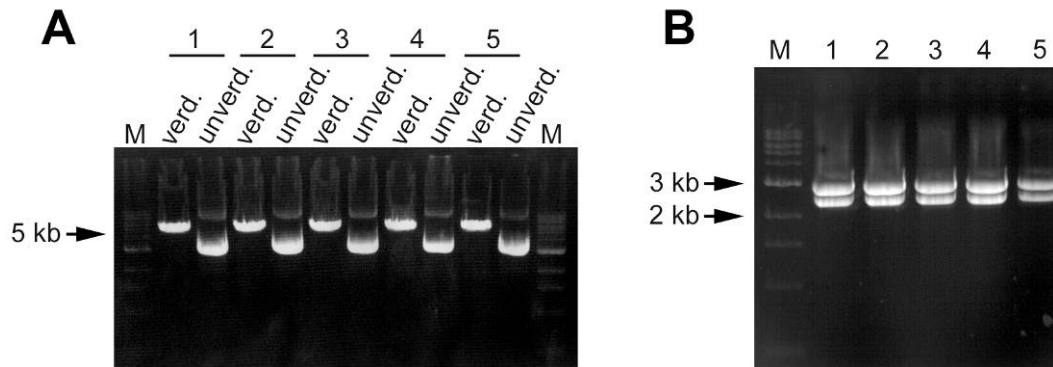


Abb. 11 Analytische Restriktionen von fünf unabhängigen Klonen des Vektorkonstruktes pBS/VHKL25/ClaI-/loxP zum Nachweis der Klonierung einer zusätzlichen LoxP-site. A) Die Restriktion mit ClaI führte durch die Anwesenheit einer ClaI-Restriktionsschnittstelle im loxP-DNA-Fragment zur Linearisierung des 5,5 kb großen DNA-Konstruktes. B) Die Restriktion mit EcoRI/ClaI führte zu einem 3 kb Fragment, welches den Vektor-backbone enthält und zu einem 2,5 kb großen Fragment, welches der VHKL25-Region entspricht.

8.1.2.4 Klonierung der V_H6H4 -Region in pBS/ V_H KL25/ClaI-/loxP

Der Vektor p6H4C μ wurde zur Herstellung der transgenen 6H4 μ -Maus verwendet (Heppner, F. L. *et al.*, 2001b). Er enthält die rearrangierte variable Region der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers 6H4, welche unter der Kontrolle eines virusspezifischen Promotors steht. Durch Restriktion mit *NaeI* konnte ein ca. 2 kb großes Fragment mit *blunt ends* isoliert werden, welches die V_H6H4 -Region und den Promotor enthält (Abb. 12A). Zur Klonierung des V_H6H4 -*NaeI*-Fragments wurde dieses mit dem *EcoRV* restringiertem Vektorkonstrukt pBS/ V_H KL25/ClaI-/loxP ligiert (Abb. 12A). Da es sich hierbei um eine *blunt-end*-Klonierung handelte und die V_H6H4 -Region invers zur V_H KL25-Region kloniert werden sollte, wurden zur Verifizierung der Orientierung der V_H6H4 -Region analytische Restriktionen mit *EcoRI/NcoI* durchgeführt. Diese Restriktion bietet den Vorteil das *NcoI* die V_H6H4 -Region in asymmetrisch große Fragmente schneidet, was eine Aussage über die Orientierung des Fragments innerhalb des Vektorkonstruktes zulässt. Befindet sich die V_H6H4 -Region in der gewünschten Orientierung, werden bei einer *EcoRI/NcoI*-Restriktion Fragmentgrößen von 4 kb für den Vektor-*backbone*, 1,8 kb für die V_H KL25-Region und 1,5 kb für die asymmetrisch geschnittene V_H6H4 -Region erwartet (Abb. 12B; Abb. 13). Liegt die V_H6H4 -Region in der falschen Orientierung vor, werden nach Restriktion Fragmente in Größen 5,1 kb für den Vektor-*backbone*, 1,8 kb für die V_H KL25-Region und 0,5 kb für die

V_H6H4-Region erwartet (Abb. 12B). Die Klonierung des V_H6H4-*NaeI*-Fragments in richtiger Orientierung in pBS/V_HKL25/*ClaI*/*loxP* wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt (siehe Anhang, D).

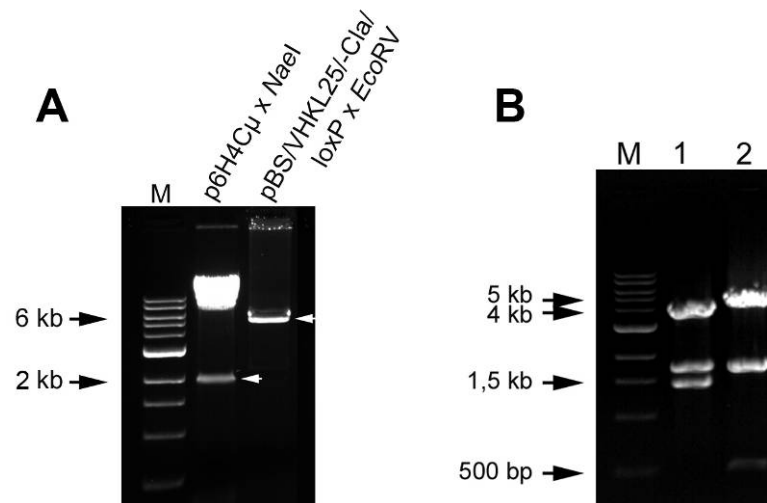
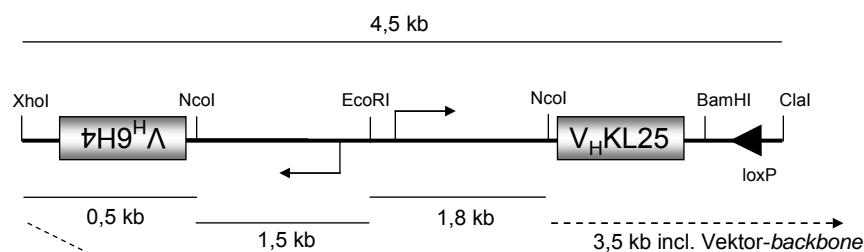


Abb. 12 Klonierung von VH6H4 in pBS/VHKL25/*ClaI*/*loxP*. A) 10 µg p6H4Cμ wurden mit *NaeI* restringiert, um das 2 kb große VH6H4-Fragment zu isolieren. Zur Klonierung des VH6H4-Fragment wurden 5 µg pBS/VHKL25/*ClaI*/*loxP* mit *EcoRV* linearisiert und anschließend mit CIP behandelt. B) Analytische Restriktion der Klonierung von VH6H4 in pBS/VHKL25/*ClaI*/*loxP* mit *EcoRI*/*NcoI*.

Switch-Kassette



Targeting Konstrukt

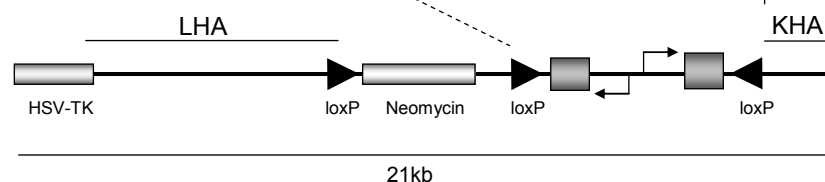


Abb. 13 Schematische Darstellung der switch-Kassette und des Targeting Konstrukts. Für Klonierung wichtige Restriktionsschnittstellen und Fragmentgrößen einer *EcoRI*/*NcoI*-Restriktion sind aufgeführt. Die switch-Kassette konnte über *XhoI*/*ClaI* extrahiert und in den *Sall*/*ClaI* geöffneten Targeting-Vektor kloniert werden.

8.1.2.5 Klonierung der *switch*-Kassette in $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$

Die in *pBluescript*IIISK+ klonierte *switch*-Kassette wurde in einem letzten Klonierungsschritt in den Targeting-Vektor $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ überführt (Abb. 13). Hierzu wurde die *switch*-Kassette zunächst durch Restriktion des Konstruktes mit *XhoI/ClaI* aus *pBluescript*IIISK+ herausgeschnitten. Abb. 14 A zeigt die im Agarosegel isolierte 4,5 kb große *switch*-Kassette. Der 18 kb große Targeting-Vektor $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ wurde zunächst durch Restriktion mit *SalI/ClaI* geöffnet (Abb. 14 A). Um eine Religation zu verhindern, wurde anschließend der Vektor mit CIP dephosphoryliert. Die Klonierung der *switch*-Kassette in den Targeting-Vektor $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ wurde zunächst durch analytische Restriktionen mit *BamHI* und *EcoRI* überprüft. Durch Restriktion des leeren Targeting-Vektors $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ mit *BamHI* wurden

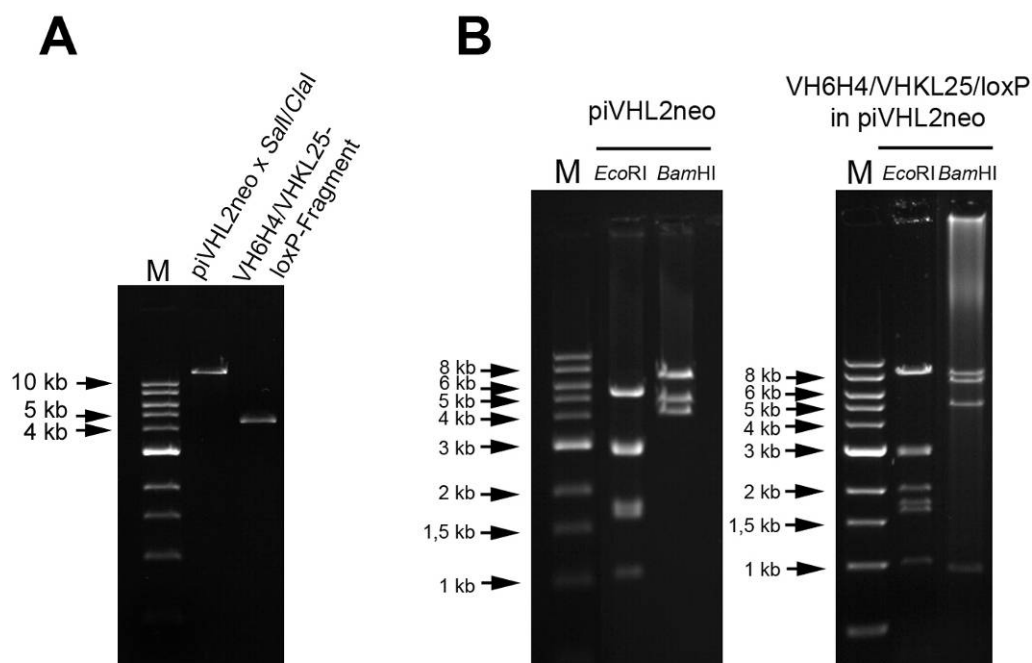


Abb. 14 Klonierung der *switch*-Kassette in den Targeting-Vektor $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$. A) Der ca. 18 kb große Targeting-Vektor $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ und die 4,5 kb große *switch*-Kassette führen zum Targeting-Konstrukt $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$. B) Das Targeting-Konstrukt $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ konnte zunächst über Restriktionen mit *BamHI* und *EcoRI* verifiziert werden

drei charakteristische Fragmente erzeugt. Der lange homologe Arm ließ sich als ~8 kb großes Fragment im Agarosegel nachweisen. Die HSV-TK-Kassette und der vorhandene Vektor-*backbone* von *pBluescript*IIISK+ bilden ein ~5,1 kb großes Fragment. Der kurze homologe Arm, die Neomycin-Kassette und ein Rest des langen homologen Arms ergeben ein ca. 4,1 kb großes Fragment (Abb. 14 B). Nach Klonierung der *switch*-Kassette in $\pi V_{HL2}\text{-neo}^r$ und *BamHI*-Restriktion erschien ein zusätzliches 0,9 kb großes Fragment im Agarosegel. Dieses

entspricht dem kurzen homologen Arm, der durch das Einbringen einer zusätzlichen *Bam*HI-Schnittstelle nun aus dem Konstrukt herausgeschnitten werden kann. Die *switch*-Kassette bildete mit der Neomycin-Kassette ein ~7,8 kb großes Fragment, während alle weiteren Fragmente keiner Größenänderungen unterlagen. Durch *Eco*RI-Restriktion von piV_HL2-neo^r und des Targeting-Konstrukts ließen sich Fragmente in den Größen 1,1 kb, 1,5 kb, 1,7 kb und 3 kb nachweisen, die keiner Größenänderung unterlagen und dem langen homologen Arm zugeordnet werden konnten. Die Restriktion des Targeting-Konstrukts führte im Vergleich zu piV_HL2-neo^r zu einem zusätzlichen 2 kb-Fragment, welches der V_H6H4-Region entsprach. Die V_HKL25-Region und der kurze homologe Arm vergrößerten das 5,1 kb Fragment, welches die HSV-TK-Kassette und den Vektor-*backbone* enthielt, auf ~8,4 kb. Das Vorhandensein der V_H6H4- und der V_HKL25-Region im Targeting-Konstrukt wurde anschließend durch spezifische PCRs nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Position und Vollständigkeit der *switch*-Kassette im Targeting-Vektor wurden durch eine ca. 6,2 kb überspannende DNA-Sequenzierung nukleotidgenau verifiziert (siehe Anhang, E).

8.1.3 Targeting von murinen embryonalen Stammzellen

Der Targeting-Vektor pV_HKL25-6H4-flox wurde durch Elektroporation in murine ES Zellen transfiziert. Für jede Elektroporation wurden 10 µg des Targeting-Vektors zunächst mit *Not*I linearisiert (Abb. 15). *Not*I ist eine unique Restriktionsschnittstelle und befindet sich am 3'-Ende des kurzen homologen Arms. Nach der Elektroporation wurden die ES Zellen in Zellkulturschalen auf einen *monolayer* von MEFs ausgesät. Nach 24 h wurde dem ES Zell-Medium Geneticin[®] (G418) als positiver Selektionsmarker zugesetzt. 48 h nach der Elektroporation wurde zusätzlich der negative Selektionsmarker Cymevene[®] zugegeben. Nach 10-12 Tagen wurden die überlebenden ES Zell-Klone gepickt und vereinzelt weiter kultiviert. Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in den genomischen schwere Kette Ig-Lokus wurde durch eine spezifische *screening*-PCR überprüft (siehe 8.1.4.2).

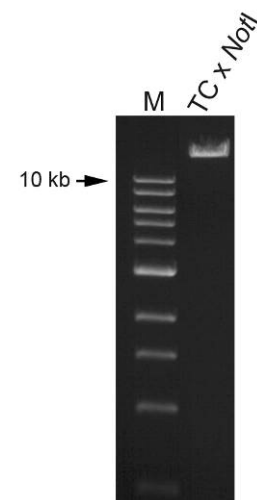


Abb. 15 Linearisierung des Targeting-Vektors mit *Not*I. Je 10 µg des Targeting-Vektors pV_HKL25-6H4-flox wurden vor der Elektroporation von ES Zellen mit *Not*I restringiert. Die vollständige Restriktion wurde mit 300 ng geschnittener Vektor-DNA im Agarosegel überprüft. M, Marker; TC, Targeting Konstrukt.

8.1.4 Screening nach homolog rekombinierten ES-Zell-Klonen

8.1.4.1 Etablierung der screening PCR

Zur Identifikation von positiven ES Zell-Klonen, die durch homologe Rekombination das Targeting-Konstrukt im IgH-Lokus integriert haben, wurde zunächst eine spezielle *screening*-PCR entwickelt. Mit Hilfe der *screening*-PCR sollten positive ES Zell-Klone von ES Zell-Klonen unterschieden werden, die das Targeting-Konstrukt nicht oder zufällig im Genom integriert haben. Des Weiteren musste die PCR sensitiv genug sein, um sicherzustellen dass die seltenen positiven Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurde das Primerpaar der *screening*-PCR so gewählt, dass ein entsprechendes PCR-Produkt nur dann entsteht, wenn das Targeting-Konstrukt an der gewünschten Position ins Genom integriert wurde. Der Primer p322 bindet hierbei innerhalb des Targeting-Konstrukts im JH2-Element der V_HKL25-Region. Der Primer (pHE3) bindet innerhalb des μ -intron-enhancer im genomischen Bereich des IgH-Lokus (Abb. 16).

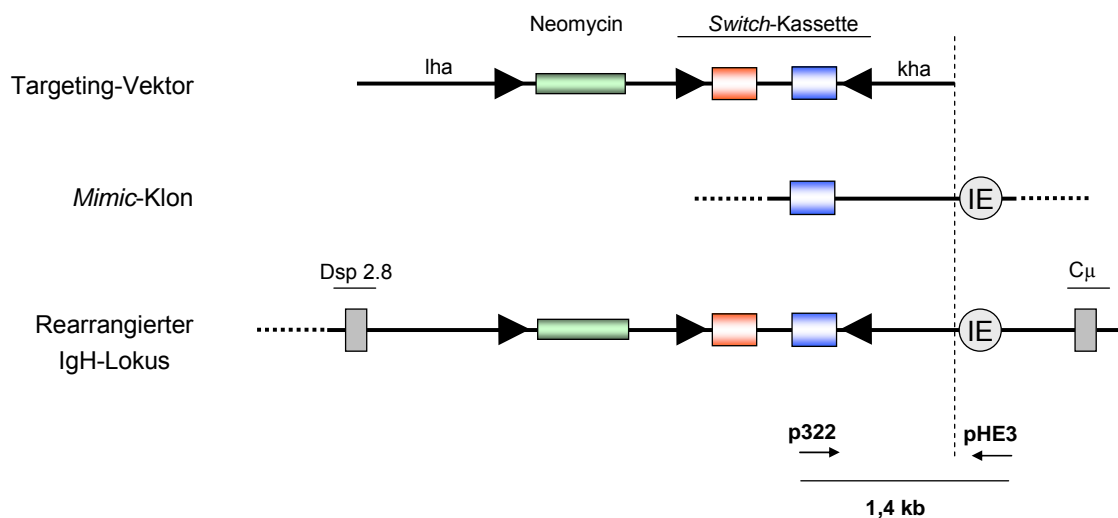


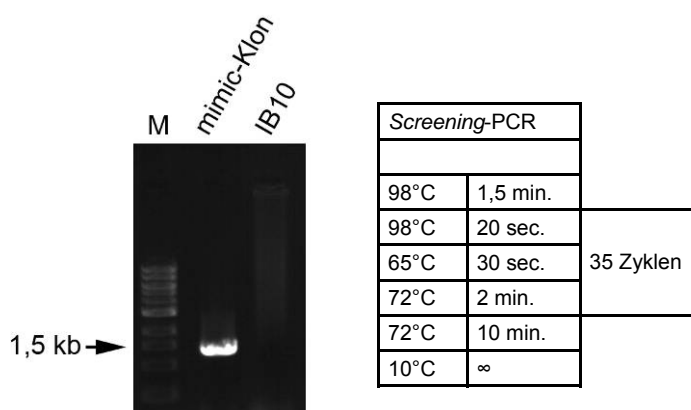
Abb. 16 Homolog rekombinierte ES Zell-Klonen wurden durch PCR identifiziert. Das Targeting-Konstrukt, der mutierte IgH-Lokus und der für die PCR wichtige Bereich des verwendeten *mimic*-Klons sind schematisch dargestellt. In positiven ES Zell-Klonen erzeugt das Primerpaar p322/pHE3 ein 1,4 kb großes PCR-Produkt. Zur Etablierung der *screening*-PCR wurde ein *mimic*-Klon verwendet. IE, *intron enhancer*, schwarze Dreiecke, loxP-Sequenzen

Zur Etablierung der *screening*-PCR wurde auf einen bereits existierender ES Zell-Klon zurückgegriffen, der zur Herstellung der TgH(KL25)-Maus verwendet wurde (Hangartner, L. *et al.*, 2003). Unter Verwendung des auch hier verwendeten Targeting-Vektors piV_HL2neo^r wurde dabei die V_HKL25-Region in den genomischen IgH Lokus dieses ES Zell-Klons

integriert. Diese Konstellation imitiert die Verhältnisse im IgH-Lokus nach erfolgreicher homologer Rekombination und erlaubte es, diesen ES Zell-Klon als *mimic*-Klon für die Etablierung der *screening*-PCR zu verwenden (Abb. 16).

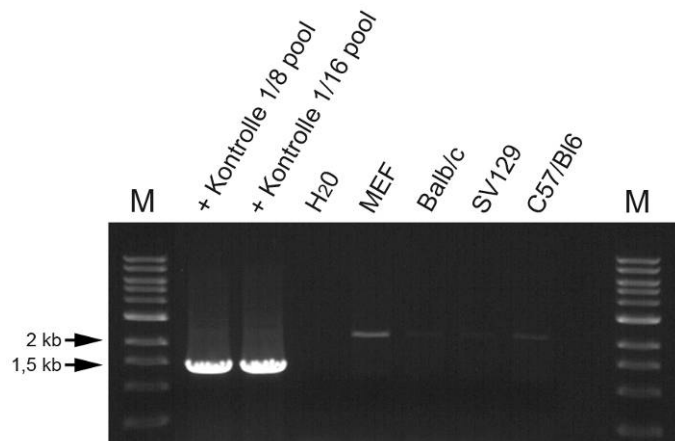
Zum Nachweis der Funktionalität der *screening*-PCR, wurde zunächst genomische DNA des *mimic*-Klons und von IB10 ES Zellen präpariert. Die PCR wurde unter Verwendung der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase und den in Abb. 17 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Wie erwartet konnte aus dem *mimic*-Klon ein 1,4 kb großes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Dieses PCR-Produkt ließ sich nicht mit genomischer DNA von IB10-ES Zellen reproduzieren (Abb. 17).

Abb. 17 Funktionalität der screening-PCR. Jeweils 100 ng genomische DNA wurden zur PCR eingesetzt. Der *mimic*-Klon konnte als 1,4 kb großes Fragment im Agarosegel nachgewiesen werden. IB10 ES Zellen liefern kein unspezifisches PCR-Signal. M, Marker.



Nach Transfektion von ES Zellen mit dem Targeting-Vektor müssen oftmals mehrere hundert Klone isoliert und per PCR analysiert werden. Um diesen Aufwand zu reduzieren, wurde versucht ES Zell-Klone in Gruppen (pools) zu analysieren. Um die Nachweisgrenze eines positiven ES Zell-Klons unter mehreren negativen ES Zell-Klonen zu bestimmen, wurde dazu die genomische DNA von 1 positiven *mimic*-Klon und 7 negativen ES Zell-Klonen, bzw. 1 positiven und 16 negativen ES Zell-Klonen vereinigt und in der *screening*-PCR eingesetzt. Wie aus Abb. 18 ersichtlich wird, konnte ein *mimic*-Klon in 8 bzw. 16 unabhängigen ES Zell-Klonen per PCR identifiziert werden. Somit war es möglich bis zu 16 ES Zell-Klone mit einer einzigen PCR zu analysieren und ein effizientes screening zu ermöglichen. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass durch die verwendeten Primerpaare falsch-positive Signale auftreten. Hierzu wurde genomische DNA von MEFs und Gewebeproben verschiedener Mausstämmen in der *screening*-PCR verwendet. Ein schwaches, unspezifisches ca. 2,2 kb großes Fragment ließ sich nach Auftrennung im Agarosegel nachweisen (Abb. 18).

Abb. 18 Etablierung der screening-PCR. In 8er- und 16er-pools konnte jeweils ein mimic-Klon per PCR nachgewiesen werden. Positive ES Zell-Klone erzeugen ein 1,4 kb großes PCR-Produkt. In negativen ES Zell-Klonen ist dieses Fragment nicht nachweisbar. Zur PCR wurden jeweils 100 ng genomische DNA eingesetzt.



8.1.4.2 Identifikation von positiven Stammzellklonen durch PCR

Die genomische DNA von jeweils 8 isolierten ES Zell-Klonen wurde vereinigt und in der *screening*-PCR eingesetzt. Positive ES Zell-Klone innerhalb eines *pools*, konnten durch PCR und anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Identifikation des positiven ES Zell-Klons innerhalb eines *pools*, wurde genomische DNA der Einzelnen im jeweiligen *pool* vorhandenen ES Zell-Klone präpariert und die *screening*-PCR

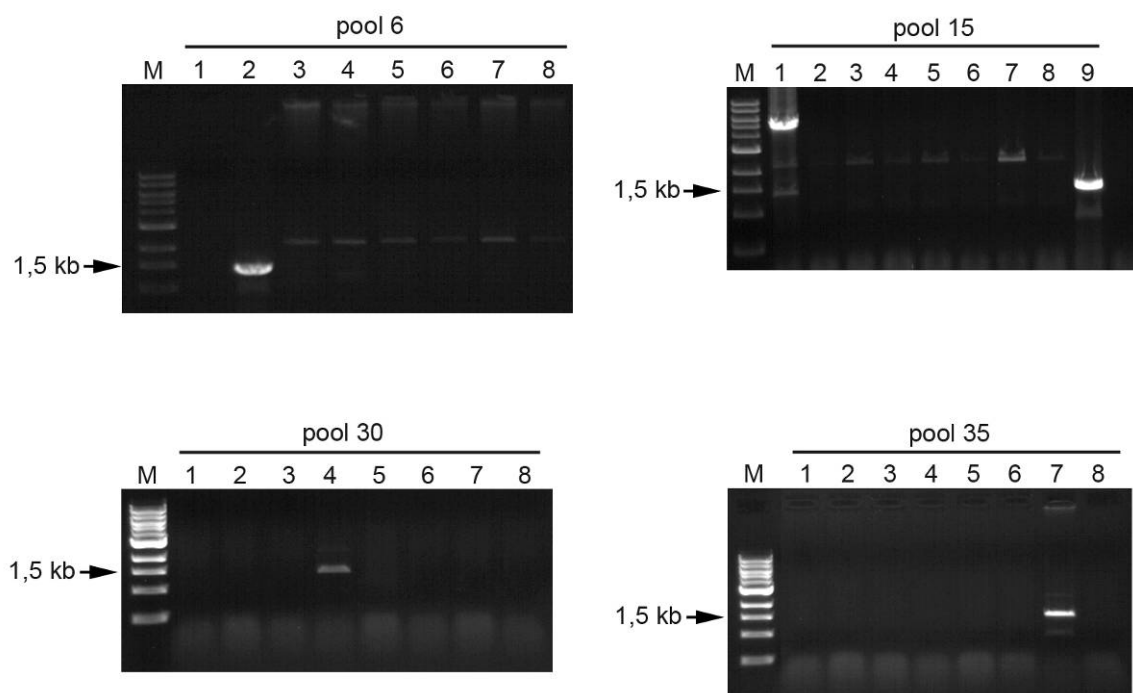


Abb. 19 Identifikation von positiven ES Zell-Klonen mittels PCR. Genomische DNA der gepickten ES Zell-Klone wurde in der *screening*-PCR eingesetzt. Insgesamt 4 unabhängige ES Zell-Klone, innerhalb eines *pools*, konnten somit identifiziert werden.

erneut durchgeführt. Insgesamt konnten mit dieser Methode 4 unabhängige Stammzellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt, durch homologe Rekombination, in den IgH-Lokus integriert hatten (Abb. 19).

8.1.4.3 Verifizierung von positiven ES Zell-Klonen durch Southern Blot

Zur Verifizierung der homologen Rekombination des Targeting-Konstrukts in den genomischen Ig schwere Kette Lokus, wurden zusätzlich genomische Southern Blots durchgeführt. Durch Southern Blot ließ sich der Ort der Integration des Targeting-Konstrukt eindeutig nachweisen. Hierzu wurde genomische DNA der 4 positiven ES Zell-Klone durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und mit *EcoRI* restringiert. Ein unverändertes WT-Allel ließ sich als 6 kb-Bande, ein durch Integration des Targeting-Konstrukts mutiertes Allel als 4 kb Bande im Southern Blot nachweisen (Abb. 20). Die restringierte DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer durch PCR hergestellten und radioaktiv markierten DNA-Sonde (HE-Sonde) (Abb. 21 A), welche 3' des integrierten Targeting-Konstrukts im *intron enhancer* bindet, durchgeführt. Durch das Signal der radioaktiven DNA-Sonde, dass auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde, konnte der Genotyp der ES Zell-Klone bestimmt werden. Wie

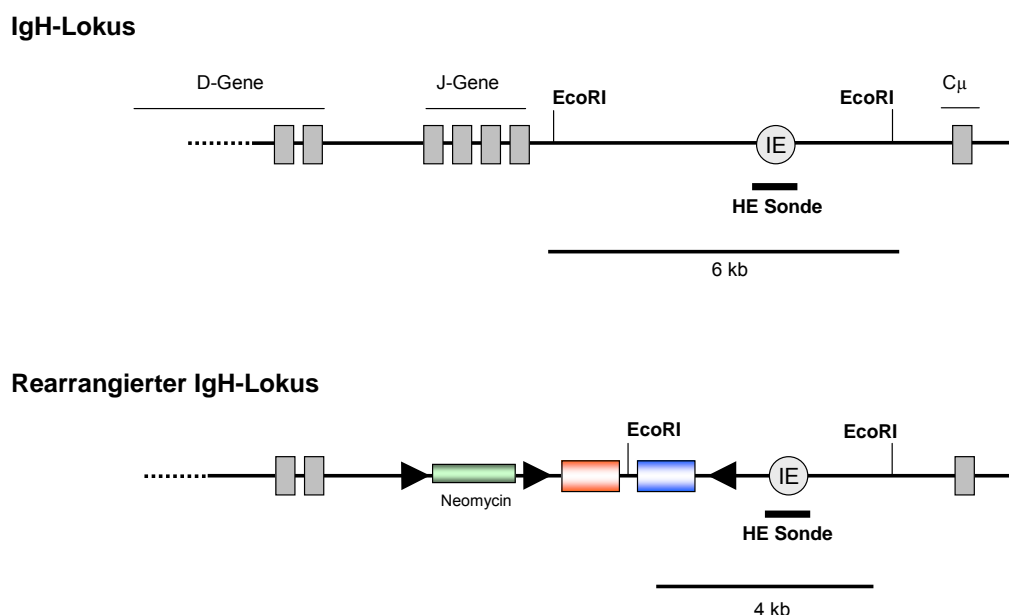


Abb. 20 Schema des genomischen Southern Blots zum Nachweis der Integration des Targeting-Konstruktes in den genomischen Ig schwere Kette Lokus. Die durch PCR hergestellte HE-Sonde bindet außerhalb des Targeting-Konstrukts im *intron enhancer*. Durch Restriktion von genomischer DNA der ES Zell-Klone mit *EcoRI*, läßt sich das WT-Allel vom mutierten Allel, durch den Größenunterschied der erzeugten Fragmente, unterscheiden.

erwartet konnte in unveränderten IB10 ES Zellen beide WT-Allele durch ein 6 kb-Fragment im Southern Blot nachgewiesen werden (Abb. 21 B). In den ES Zell-Klonen 6_2 / 30_4 und 35_7 konnte die Integration des Targeting-Konstrukts durch das zusätzlich entstandene 4 kb-Fragment bestätigt werden. Der in der *screening*-PCR positiv getestete ES Zell-Klon 15_9 konnte durch die Southern Blot-Analyse, auf Grund des fehlenden 4 kb-Fragments, nicht verifiziert werden und wurde für die Herstellung der transgenen Maus nicht weiter verwendet.

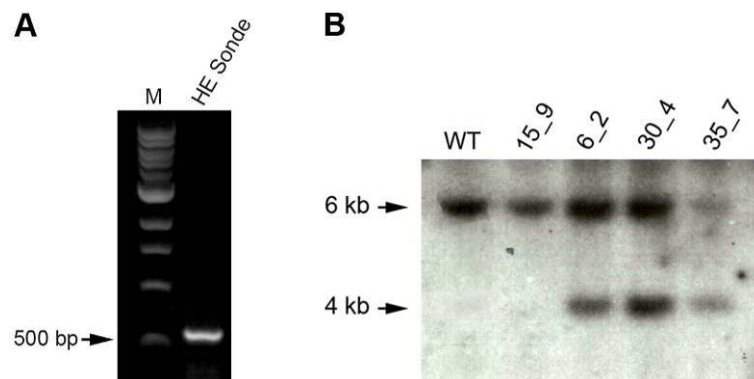


Abb. 21 A) Herstellung der HE-Sonde mittels PCR. Unter Verwendung der Primer pHE3/pHE5 wurde die 644 bp große DNA-Sonde hergestellt. Als Matritze diente genomische DNA von IB10 ES Zellen. **B) Verifizierung von positiven ES Zell-Klonen mittels genomischem Southern Blot.** Jeweils 10 µg genomische DNA wurde mit *EcoRI* restringiert, über ein Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte HE-Sonde verwendet. WT-Allele ließen sich als 6 kb große Fragmente nachweisen. Aus der Integration des Targeting-Konstrukts resultierten 4 kb große Fragmente.

8.1.5 Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette

Auf Grund der Tatsache, dass der vergleichsweise starke Promoter der Neomycin-Kassette einen Einfluss auf die Aktivität proximaler, endogener Promotoren haben kann, musste die Neomycin-Kassette aus dem Genom der positiven ES Zell-Klone entfernt werden, bevor diese in Blastocysten mikroinjiziert werden konnten. Dazu wurden die positiven ES Zell-Klone mit dem Vektor pGK-puroCre (A. di Nardo, unveröffentlicht) transient transfiziert. Dieser Vektor beinhaltet die codierende Sequenz für das Enzym Cre-Rekombinase. Da die Neomycin-Kassette von loxP-Sequenzen flankiert wird, ist es möglich diese durch transiente Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom zu deletieren. Zur Positiv-Selektion von erfolgreich transfizierten ES Zell-Klonen beinhaltet der Vektor zusätzlich eine Puromycin-Resistenz-Kassette.

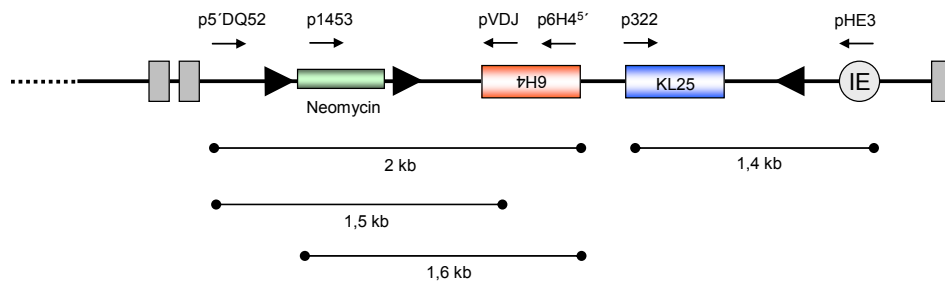
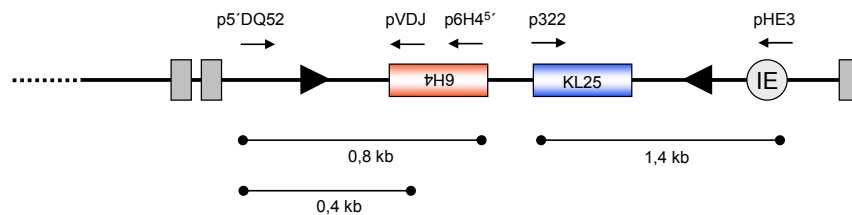
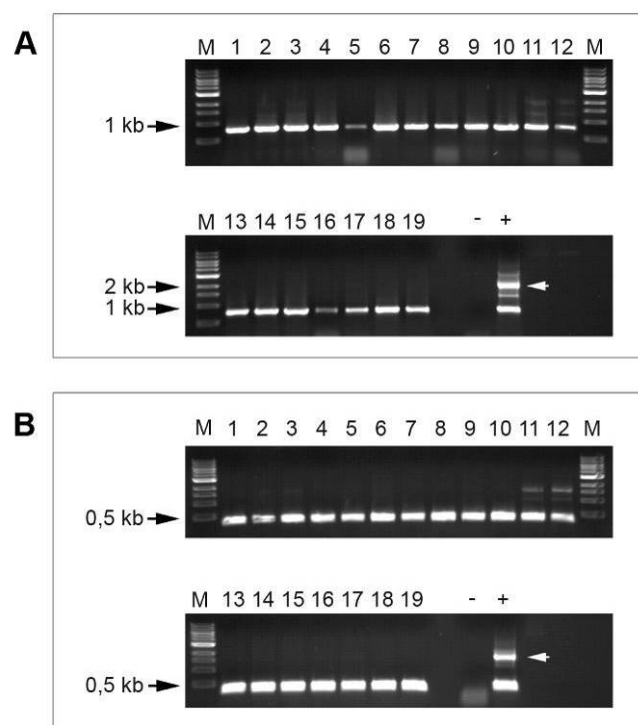
Rearrangierter IgH-Lokus**Nach Neomycin-Deletion**

Abb. 22 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette mittels PCR. Die genomische Situation vor und nach der Deletion der Neomycin-Kassette sind schematisch dargestellt. Ebenso die verwendeten Primer und die erwarteten Fragmentgrößen.

Die positiven ES Zell-Klone wurden mit 10 µg des zirkulären Vektors elektroporiert und anschließend auf MEFs ausgesät. Nach 1 Tag wurde dem Kulturmedium für 24 Stunden 1,25 µg Puromycin/ml zugegeben. Diese 24 Stunden waren ausreichend um ES Zellen zu selektionieren, die erfolgreich mit pGK-puroCre transfiziert wurden. Nach 10 Tagen Kultivierung wurden ES Zell-Klone gepickt. Je 50 % eines gepickten ES Zell-Klons wurden auf MEFs ausgesät und in ES Zell-Medium expandiert. Zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Kassette wurde die andere Hälfte jedes gepickten Klons in G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Nach ca. 5 Tagen in G418-haltigem Selektionsmedium starben Neomycin-sensitive ES Zell-Klone, was auf die Deletion der Neomycin-Kassette hinwies. Der parallel dazu, ohne Selektionsmedium kultivierte Teil dieser ES Zell-Klone, wurde anschließend weiter expandiert. Zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Kassette aus dem Genom der positiven ES Zell-Klone, wurden mehrere PCRs entwickelt die dies eindeutig belegen sollten (Abb. 22). Durch Verwendung des Primerpaars p5′DQ52 / p6H4^{5′} erzeugten nicht-deletierte ES Zell-Klone ein 2 kb großes Fragment. Nach Deletion der Neomycin-Kassette ließ sich ein 0,8 kb großes Fragment nachweisen. Durch das Primerpaar p5′DQ52 / pVDJ wurde in nicht-deletierten ES Zell-Klonen ein 1,5 kb großes Fragment erwartet, in deletierten ES Zell-Klonen verringerte sich die Fragmentgröße auf 0,4 kb. Um das Vorhandensein von Mischklonen auszuschließen wurde das Primerpaar p1453 / p6H4^{5′} verwendet. ES Zell-Klone aus denen die Neomycin-Kassette nicht deletiert wurde, ließen sich

durch ein 1,6 kb großes PCR-Produkt nachweisen. In deletierten ES Zell-Klonen ist kein Signal in der PCR zu erwarten. Die transiente Expression der Cre-Rekombinase hätte nicht nur zur Deletion der Neomycin-Kassette führen können, sondern auch die Inversion der ins Genom eingebrachten *switch*-Kassette. Um diese Inversion auszuschließen und somit die richtige Orientierung der Kassette nachzuweisen, wurde das Primerpaar p322 / pHE3 verwendet, welches schon beim screening nach positiven ES Zell-Klonen eingesetzt wurde (siehe 8.1.4.1). In Abb. 23 sind die Ergebnisse dieser PCRs für Subklone des positiven ES Zell-Klons 6_2 exemplarisch dargestellt. Nach transienter Expression der Cre-Rekombinase in ES Zell-Klon 6_2 wurden 9 unabhängige Subklone isoliert und auf Deletion der Neomycin-Kassette überprüft. Bei 17 der 19 Subklone konnte die Deletion der Neomycin-Kassette durch das erwartete 0,8 kb-Fragment (Abb. 23 A) bzw. des 0,4 kb-Fragments (Abb. 23 B) bestätigt werden. Lediglich in Subklon 11 und 12 ließ sich die Neomycin-Kassette durch eine schwache 2 kb- bzw. 1,5 kb-Bande im Agarosegel nachweisen. Ebenso konnte das Vorhandensein von Mischklonen ausgeschlossen werden (Abb. 23 C). Nur bei den Subklonen 11 und 12 zeigte sich eine schwache 1,6 kb Bande im Agarosegel, was auf eine unvollständige Deletion der Neomycin-Kassette hinwies. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass in allen Subklonen keine Inversion der *switch*-Kassette stattgefunden hatte (Abb. 23 D). Isolierte Subklone der ES Zell-Klone 30_4 und 35_7 wurden auf die gleiche Weise analysiert und bestätigt (Daten nicht gezeigt).



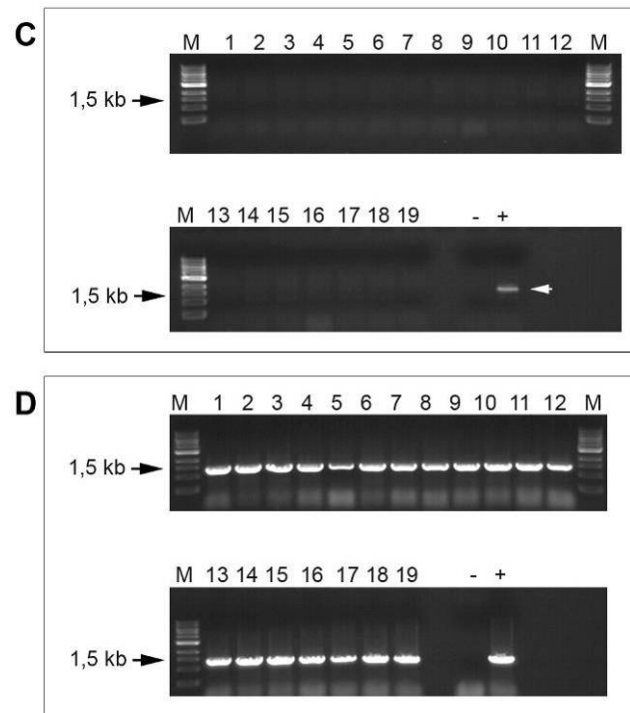


Abb. 23 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette durch PCR. Der Nachweis der Deletion wurde unter Verwendung der Primerpaare **A)** p5'DQ52/p6H4^{5'} und **B)** p5'DQ52/pVDJ durchgeführt **C)** Das Vorhandensein von Mischklonen wurde mit dem Primerpaar p1453/p6H4^{5'} ausgeschlossen. **D)** Die richtige Orientierung der *switch*-Kassette war, auch nach transienter Expression von Cre-Rekombinase, unter Verwendung der Primer p322/pHE3 nachweisbar. Je PCR wurden 100 ng genomischer DNA verwendet. – Wasserkontrolle, + genomische DNA des ES Zell-Klons 6_2, M Größenmarker

8.1.6 Generierung transgener Mäuse

8.1.6.1 Herstellung chimärer Mäuse mittels Mikroinjektion von ES Zellen

Wie zuvor beschrieben, konnten mehrere unabhängige ES Zell-Klone identifiziert werden, die durch homologe Rekombination das Targeting-Konstrukt in den IgH-Lokus integriert haben. Aus dem Genom dieser positiven ES Zell-Klone wurde anschließend die Neomycin-Resistenz-Kassette eliminiert, was zu der Generierung mehrerer Subklone führte, die schließlich zur Mikroinjektion in murine Blastozysten verwendet wurden. ES Zell-Klone die in die Wirtsblastozyste injiziert und in pseudoschwangere Mäuse implantiert wurden, haben theoretisch die Fähigkeit zu allen Geweben einer Maus beizutragen, einschließlich der Keimbahn. Der sich daraus entwickelnde Embryo ist eine genetische Chimäre. Chimären enthalten zwei Populationen von Zellen, die aus verschiedenen Zygoten abstammen: diejenigen der Blastozyste und die der implantierten Stammzellen. Sie sind somit partiell transgene Tiere.

In Tabelle 16 sind die für die Mikroinjektion verwendeten ES Zell-Klone, Blastozysten und die daraus resultierenden Nachkommen aufgeführt. Subklone des ES Zell-Klons 6_2 wurden am *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), Monterotondo Scalo, Italien in Blastozysten mit C57Bl/6 genetischem Hintergrund mikroinjiziert. Subklone des ES Zell-Klons 30_4 wurden an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz sowohl in Blastozysten mit C57Bl/6, als auch mit Balb/c genetischem Hintergrund mikroinjiziert. Die daraus resultierenden Tiere wiesen einen Fell-Chimärismus von 5-100% auf (Abb. 24) und wurden anschließend zur Generierung vollständig transgener Tiere weiterverpaart (siehe 8.1.6.2)

ES Zell Klon	Subklon	Mikroinjiziert	Implantierte Blastozysten	Genetischer background	Resultierende Nachkommen	Anzahl chimärer Tiere	Chimärismus
6_2	6_2_10	EMBL	67	C57Bl/6	18	6	5-20%
	6_2_18	EMBL	244	C57Bl/6	42	13	5-25%
	6_2_21	EMBL	90	C57Bl/6	keine	keine	-
	6_2_22	EMBL	60	C57Bl/6	12	4	15-20 %
	6_2_26	EMBL	72	C57Bl/6	11	keine	-
30_4	30_4_4	Mainz	25	Balb/c	6	2	50-70%
	30_4_5	Mainz	20	Balb/c	8	2	80-90%
	30_4_5	Mainz	13	C57Bl/6	7	3	90-100%

Tabelle 16 Herstellung chimärer Mäuse. Verschiedene ES Zell-Klone wurden durch Mikroinjektion in Blastozysten injiziert und pseudoschwangeren Weibchen implantiert. Die daraus resultierten Chimären wurden zur Generierung transgener Tiere weiterverpaart.

8.1.6.2 Verpaarung der Chimären zur Generierung transgener Tiere

Die hier verwendeten Stammzelllinie IB10 (SV/129 Hintergrund) führt zur Ausprägung der Fellfarbe Agouti (braun). Da die Fellfarbe Agouti dominant gegenüber den rezessiven Fellfarben Schwarz (C57Bl/6) und weiß (Balb/c) ist, lässt sich der Grad des Chimärismus der generierten Mäuse anhand der Fellfarbe abschätzen. Da das Transgen an die nachfolgende Generation weitervererbt werden soll, bedarf es der Beteiligung der ES Zellen an der Keimbahn. Oftmals korreliert der Grad des Fell-Chimärismus mit der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Keimbahntransmission des Transgens, sodass bevorzugt hochchimäre Tiere zur weiteren Zucht eingesetzt werden. Um die Keimbahntransmission des Transgens zu ermöglichen und somit vollständig transgene Tiere zu generieren, wurden chimäre Mäuse mit WT-Tieren des Gleichen, der jeweiligen verwendeten Blastozyste entsprechenden, genetischen Hintergrund weiterverpaart. Vollständig transgene Tiere hätten sich anschließend auf Grund der Fellfarbe Agouti identifizieren lassen. Nicht-transgene Tiere weisen die, durch den genetischen Hintergrund der Blastozyste determinierte, Fellfarbe auf. Insgesamt konnten

durch Verpaarungen 274 Nachkommen in der F1-Generation erzeugt werden. Dabei entstanden 33 Tiere mit weißer Fellfarbe und 241 Tiere mit schwarzer Fellfarbe. Eine erfolgreiche Keimbahntransmission konnte somit noch nicht festgestellt werden. Um eine erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens zu erreichen, dauern die Verpaarungen weiter an.

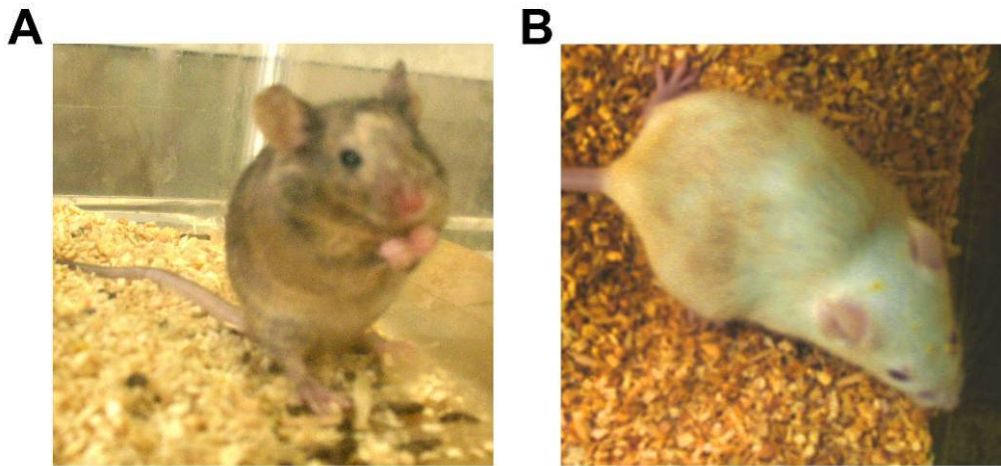


Abb. 24 Fotografien erzeugter chimäre Mäuse. Aus der Mikroinjektion von positiven ES Zell-Klonen in Blastocysten und anschließender Implantation in pseudoschwangere Weibchen, resultierten Tiere mit hohem Fell-Chimärismus. Die Beteiligung der injizierten ES Zellen am Gesamtorganismus ist durch die braune Fellfarbe an **A)** Chimären mit genetischem C57Bl/6-Hintergrund und **B)** Chimären mit Balb/c-Hintergrund feststellbar.

8.2 Einfluss von Zytokinen auf die Abwehr von Virusinfektionen

8.2.1 Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe für die Induktion anti-viraler Antikörperantworten

Neben PrP^C werden unterschiedliche Zellen und Moleküle für eine effiziente Prionen-Replikation im lymphoretikulären System (LRS) und die anschließende Neuroinvasion benötigt. Bei der peripheren Verbreitung und der Neuroinvasion von Prionen scheinen B Zellen eine wichtige Rolle spielen (Klein, M. A. *et al.*, 1997). Die Beteiligung von B Zellen an der peripheren Pathogenese ist wahrscheinlich auf indirekte Effekte, wie der Expression von Zytokinen zurückzuführen. Das proinflammatorische Zytokin Lymphotoxin α (LT α) scheint hierbei eine entscheidende Funktion zu haben. Lymphotoxin α wird hauptsächlich auf B Zellen und aktivierten T Zellen exprimiert und ist an der Reifung und Erhaltung von follikulären dendritischen Zellen (FDC) und an der Ausbildung der Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe beteiligt. Die Ablation von LT α führt zu der Eliminierung von FDCs, verhindert die Ausbildung von Keimzentren und führt zu einer generellen Zerstörung der geordneten Strukturen lymphatischer Organe (De, Togni P. *et al.*, 1994). Da FDCs nach einer Prioneninfektion PrP^{Sc} akkumulieren und die Prionenreplikation in der Milz von PrP^C-exprimierenden FDCs abhängt, führt eine Depletion von FDCs zu einer nahezu vollständigen Resistenz gegenüber einer peripheren Prioneninfektion (Prinz, M. *et al.*, 2002). Die korrekte Struktur und Architektur der lymphatischen Organe spielt somit für den Verlauf einer Prioneninfektion eine entscheidende Rolle.

Um den Einfluss der Struktur lymphatischen Organe auf die Immunantwort und die Pathogenese bei Virusinfektionen zu untersuchen, wurden Experimente mit geeigneten Mauslinien durchgeführt. Zum Einen wurden LT α -*knockout* Mäuse (LT α ^{-/-}) verwendet, die, wie oben beschrieben, eine veränderte Struktur der lymphatischen Organe aufweisen, in denen keine FDCs vorkommen und die keine Keimzentren mehr ausbilden können. Ob die Expression eines LT α / β -Transgens einen potentiellen LT α ^{-/-} Phänotyp aufheben kann, soll durch eine weitere verwendete Mauslinie analysiert werden, die ein LT α / β -Transgen unter dem T Zell-spezifischen Promoter Lck (Leukozyten-spezifische Protein Tyrosin Kinase) auf LT α ^{-/-} Hintergrund (LT α ^{-/-} LckLT α β) exprimiert.

8.2.1.1 Genotypisierung der Versuchstiere durch PCR

Mäuse mit den Genotypen $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ und C57Bl/6 LckLT $\alpha\beta$ wurden freundlicherweise von Dr. Marco Prinz, Universität Göttingen bereitgestellt. Die gelieferten Tiere der Genotypen $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ wurden im Paul-Ehrlich-Institut (PEI) weitergezüchtet. Zum Genotypisieren der Nachkommen wurden verschiedene PCRs genutzt. Zum Nachweis des *LT α -knockouts* wurden die Primer oIMR0013 und oIMR0014 verwendet, welche ein 280 bp Fragment in der PCR erzeugen. Das LckLT $\alpha\beta$ -Transgen konnte durch zwei unterschiedliche PCRs nachgewiesen werden. Durch Verwendung der Primer PrP5`for_ins und LT α _rev1 wurde das LT α -Transgen als 450 bp Fragment identifiziert. Mit dem Primerpaar PrP5`for_ins / LT β _rev1 konnte das LT β -Transgen als 370 bp großes PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 25).

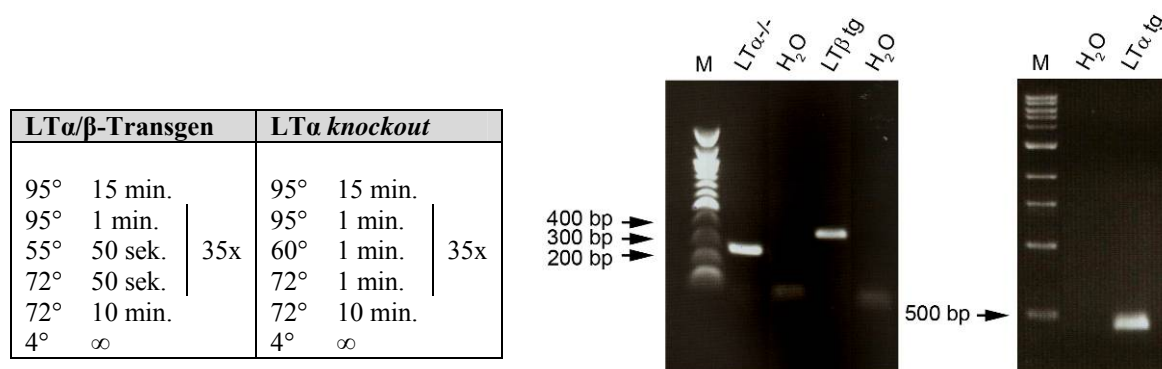


Abb. 25 Genotypisierung der Versuchstiere. Der *LT α knockout*, als auch die LT $\alpha\beta$ -Transgene wurden durch spezifische PCRs nachgewiesen. Der *LT α -knockout* lässt sich in der PCR durch ein 280 bp Fragment nachweisen. Das LT α -Transgen zeigt sich durch ein 450 bp PCR-Produkt; das LT β -Transgen als 370 bp Fragment im Agarosegel. M, Größenmarker.

8.2.1.2 Einfluss der Verabreichungsrouten und Dosis auf den Krankheitsverlauf nach einer Virusinfektion

Zunächst wurde untersucht, ob $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen einen veränderten Krankheitsverlauf nach einer Virusinfektionen aufweisen. Hierzu wurden die Versuchstiere mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) infiziert. Die Mäuse wurden unter Vollnarkose zunächst intranasal (*i.n.*) mit 10^3 bzw. 10^4 pfu (*plaque forming units*) VSV infiziert. Zur Kontrolle der erfolgreich durchgeführten Virusinfektion wurden IFNAR $^{-/-}$ Mäuse als Indikator verwendet. IFNAR $^{-/-}$ Mäuse besitzen kein funktionales Interferonsystem und sind für geringste Dosen VSV sensitiv (Muller, U. *et al.*, 1994). Alle infizierten IFNAR $^{-/-}$ Mäuse starben nach 2-3 Tagen, wohingegen WT-Mäuse in der Lage

waren 10^3 pfu VSV zu kontrollieren (Abb. 26). Ebenso zeigten $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse, als auch $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ und C57Bl/6 Lck $LT\alpha\beta$ keine signifikante Sensibilität nach VSV-Infektion. Auch nach Erhöhung der Virusdosis auf 10^4 pfu VSV *i.n.* konnte kein markanter Phänotyp in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen gegenüber WT-Mäusen identifiziert werden. Sowohl WT-Mäuse, als auch $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse waren kaum noch in der Lage das Virus unter Kontrolle zu bringen und verstarben, wie auch alle anderen infizierten Genotypen, nahezu vollständig nach 7-13 Tagen.

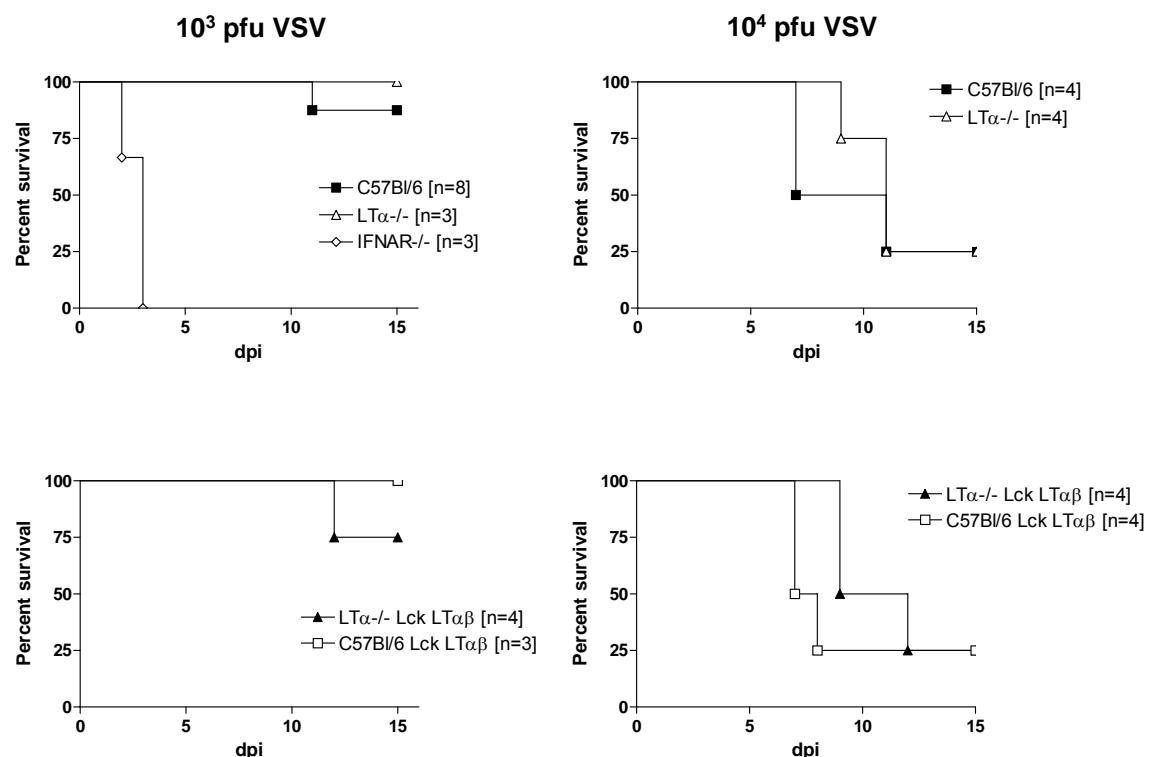


Abb. 26 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intranasaler Infektion der Versuchstiere mit VSV. C57Bl/6, $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ und C57Bl/6 Lck $LT\alpha\beta$ wurden mit 10^3 bzw. 10^4 pfu VSV *i.n.* infiziert und die prozentualen Überlebensraten über die Zeit aufgezeichnet. Eine Dosis von 10^3 pfu VSV wurde von allen Genotypen gut toleriert, wohingegen die Erhöhung der Infektionsdosis auf 10^4 pfu zum Tod nahezu aller Versuchstiere führte. Die Grafik zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment. dpi – Tage nach Infektion.

In weiteren Experimenten wurde eine weitere Verabreichungsroute gewählt und die Versuchstiere mit 10^6 bzw. 10^7 pfu VSV intravenös (*i.v.*) infiziert. Bei einer Virusdosis von 10^6 pfu lässt sich erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen feststellen (Abb. 27). Sowohl WT-Tiere, als auch $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ Mäuse tolerieren die VSV-Infektion. Erst bei Erhöhung der Infektionsdosis auf 10^7 pfu zeigen sich Unterschiede zwischen den Genotypen. Während WT-Tiere diese Dosis ebenfalls überleben,

sterben mehr als 50% der $LT\alpha^{-/-}$ Tiere 11-13 Tage nach der Infektion. Des Weiteren zeigten sich auch $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäuse sensitiv gegenüber der gewählten VSV Infektionsroute und -dosis.

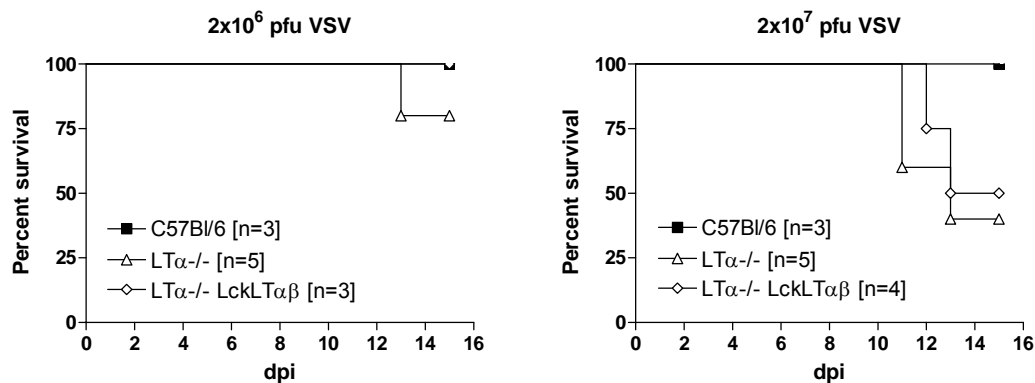


Abb. 27 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intravenöser Infektion der Versuchstiere mit VSV. C57Bl/6, $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäuse wurden mit 10^6 bzw. 10^7 pfu VSV *i.v.* infiziert und die prozentualen Überlebensraten über die Zeit aufgezeichnet. Eine Dosis von 10^6 pfu VSV wurde von allen Genotypen gut toleriert, wohingegen die Erhöhung der Infektionsdosis auf 10^7 pfu von $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäusen nicht mehr kontrolliert werden konnte. Ca. 50% der Versuchstiere verstarben in Folge der Infektion. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Experiment. dpi – Tage nach Infektion

8.2.1.3 Entstehung neutralisierender Antikörpertiter nach VSV-Infektion

VSV ist als ein starkes B Zell-Antigen bekannt. Um den Einfluss des $LT\alpha$ -knockouts auf die Induktion von B Zell-Antworten zu untersuchen, wurden WT, $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ und C57Bl/6 LckLT $\alpha\beta$ -Tiere mit der subletalen Dosis 10^3 pfu VSV *i.n.* infiziert und der Serumtiter an VSV-neutralisierenden Antikörpern, an den Tagen 4, 8, 12, und 16 nach Infektion bestimmt. Wie in Abb. 28 gezeigt wird, lassen sich nach wenigen Tagen in allen untersuchten Genotypen rasch ansteigende neutralisierende Antikörpertiter nachweisen. Diese Antikörper sind hauptsächlich vom IgM-Isotyp. Nach ca. 8 Tagen lässt sich in allen Versuchsgruppen der Isotypwechsel zu IgG feststellen. Weder funktional, noch kinetisch zeigen sich 16 Tage nach Infektion Unterschiede in den primären B Zell-Antworten von $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ oder WT-Tieren.

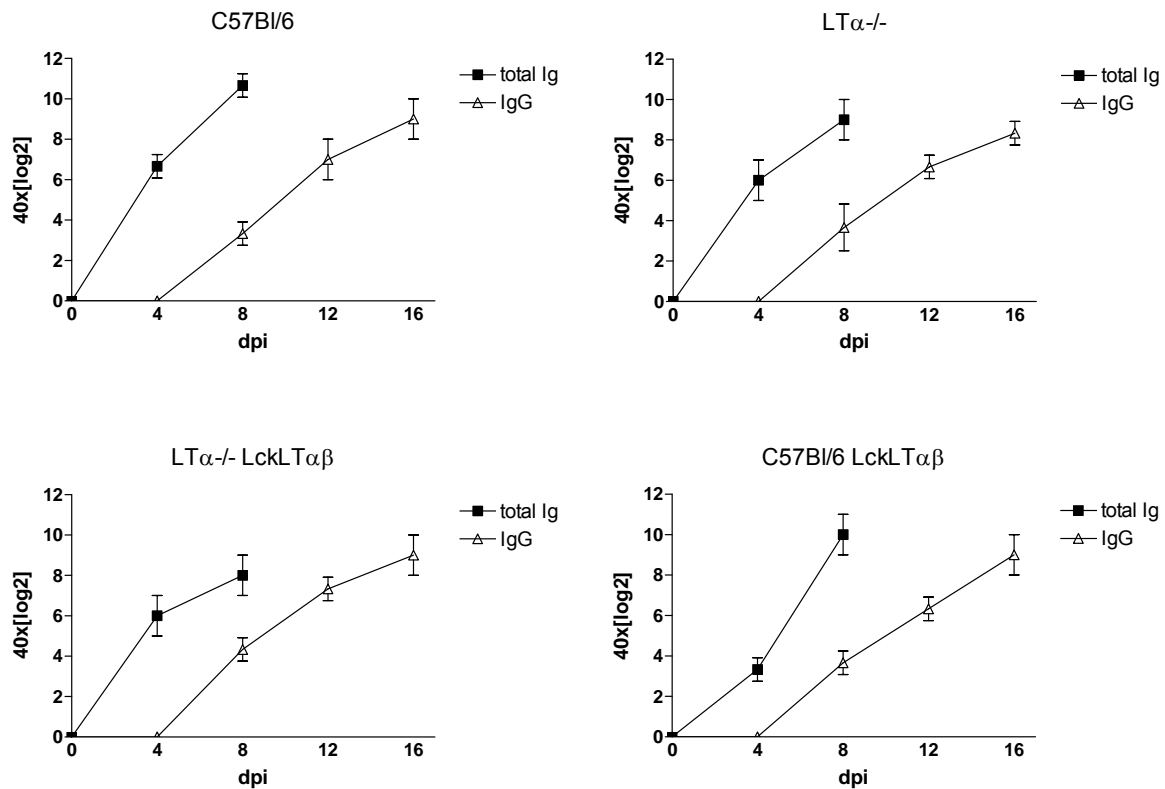


Abb. 28 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion. C57Bl/6, LTα^{-/-}, LTα^{-/-} LckLTαβ und C57Bl/6 LckLTαβ wurden mit 10³ pfu VSV *i.n.* infiziert. Der Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde aus dem Serum der Versuchstiere bestimmt. In allen Tieren kommt es ca. 4 Tage nach Infektion zur Ausbildung einer IgM-Antwort. Anschließend lässt sich nach ca. 8 Tagen der Isotypwechsel zu IgG nachweisen. dpi – Tage nach Infektion.

8.2.1.4 Einfluss der Struktur lymphatischer Organe auf das immunologische Gedächtnis

Um einen möglichen Einfluss der veränderten Strukturen der lymphatischen Organe auf die Bildung des immunologischen Gedächtnisses zu untersuchen, wurde der Titer an VSV-neutralisierenden Antikörpern zu späten Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Hierzu wurden WT, LTα^{-/-} und LTα^{-/-} LckLTαβ Mäuse mit einer subletalen Dosis von 10³ pfu VSV *i.n.* infiziert und das Serum 30 – 210 Tage nach Infektion auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper analysiert. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass alle getesteten Genotypen 30 Tage nach Infektion einen hohen VSV-neutralisierenden Antikörpertiter aufwiesen (Abb. 29). Die gemessenen Antikörper ließen sich hauptsächlich dem IgG-Isotyp zuordnen. Der Antikörpertiter sank über den gemessenen Zeitraum nur leicht ab, sodass auch nach 210 Tagen in allen Versuchsgruppen hohe Titer messbar waren. Ein

Einfluss des *LT α -knockouts* auf die Ausbildung des immunologischen Langzeitschutzes durch Antikörper, ist nach Infektion mit VSV somit nicht feststellbar.

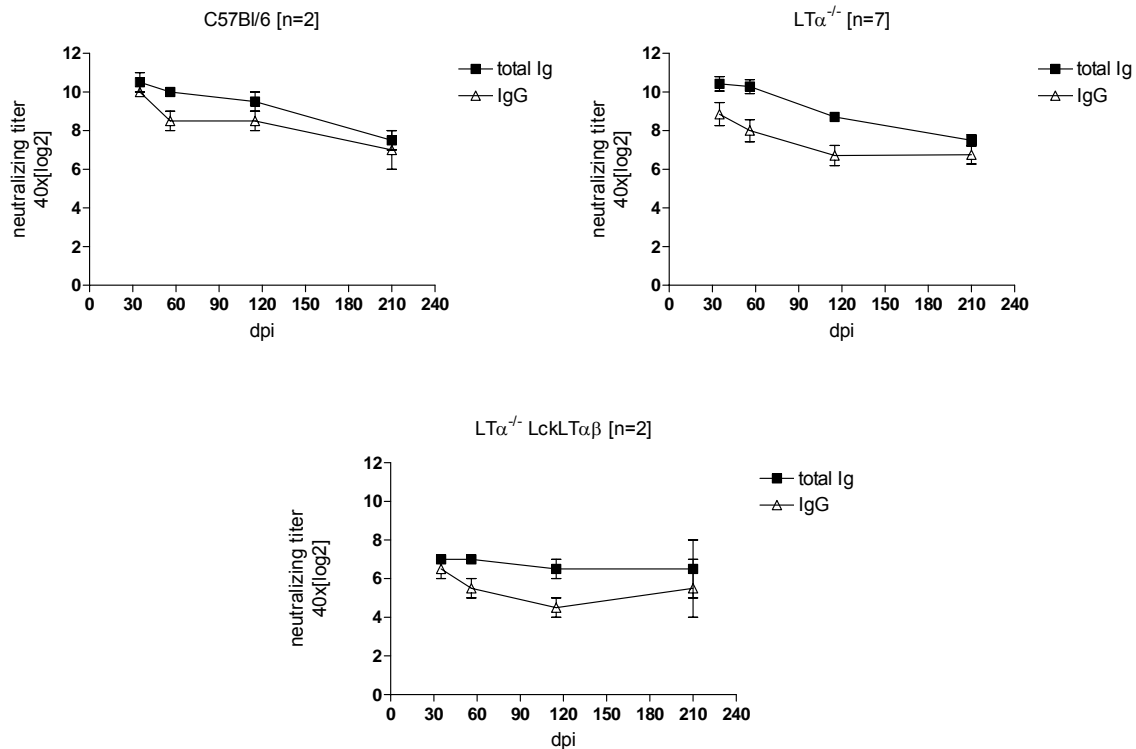


Abb. 29 Neutralisierende Langzeit-Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion. C57Bl/6, LT $\alpha^{-/-}$ und LT $\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäuse wurden mit 10^3 pfu VSV *i.n.* infiziert. Der Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde nach 30, 60, 120 und 210 Tagen aus dem Serum der Versuchstiere bestimmt. In allen Versuchgruppen lassen sich bis 210 Tage nach Infektion hohe Titer an VSV-neutralisierenden Antikörpern nachweisen. dpi – Tage nach Infektion.

8.2.1.5 Analyse von VLP-VSV induzierten neutralisierenden Antikörperantworten

Die meisten Bakterien oder Viren die den Organismus infizieren, werden vom Immunsystem umgehend als „fremd“ und „gefährlich“ erkannt und attackiert. Die molekulare Struktur eines Antigens spielt dabei eine Hauptrolle in der Induktion von Antikörperantworten. VSV exprimiert auf seiner Oberfläche hochrepetitiv das VSV-G Protein, was zu einer hohen Immunogenität des Virus führt. Zusätzlich wird das virale Genom als „Gefahren“-Signal durch TLR 7 erkannt und die Virusreplikation durch die Helikase RIG-I wahrgenommen (Kawai, T. und Akira, S., 2006, Lund, J. M. *et al.*, 2004). Die hochrepetitive Virusoberfläche kann IgM quervernetzen und führt so zu einem starken Signal, welches eine frühe IgM Antwort ohne die Notwendigkeit weiterer T Zell-Hilfe auslösen kann. VSV wird dadurch als T Zell-unabhängiges Antigen (*thymus independent* - TI) klassifiziert. Der Wechsel zum IgG-Isotyp ist jedoch T Zell-abhängig (Leist, T. P. *et al.*, 1987). Wie die bisherigen Ergebnisse

zeigen, lassen sich kaum Unterschiede in der Immunkompetenz zwischen WT und $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen nach einer VSV-Infektion erkennen. Da VSV ein starkes thymus-unabhängiges Antigen ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Auswirkungen des $LT\alpha$ -knockouts auf die Ausbildung der Immunantwort eine untergeordnete Rolle spielen. Wie jedoch reagiert eine gestörte lymphatische Architektur auf Antigene schwächerer Immunogenität? Zur Beantwortung dieser Frage wurden replikationsdefiziente, Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particle* - VLP) verwendet (Bach, P. *et al.*, 2007). Diese VLPs tragen das Hauptantigen von VSV, das VSV-Glykoprotein G (VSV-G) auf ihrer Oberfläche. VLP-VSV wurden durch Transfektion der Zelllinie HEK-293FT mit zwei unterschiedlichen Expressionsplasmiden hergestellt. *pHIT60* codiert dabei die Strukturproteine *gag* und *pol* des Murinen-Leukämie-Virus (MLV), *pmDG* exprimiert das VSV-G Protein. Das VSV-G Protein wird anschließend unspezifisch in MLV-Partikel inkorporiert, welche sich von der Zellmembran lösen (Nikles, D. *et al.*, 2005).

Zunächst wurden WT, $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ Mäuse ca. 10^9 VLP-VSV *i.n.* injiziert. Anschließend wurde 4, 8, 12 und 16 Tage nach Injektion der Level an VSV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Jedoch konnte nach *i.n.* Injektion von VLP-VSV zu keinem Zeitpunkt und in keiner Versuchsgruppe VSV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine intranasale Applikation von VLP-VSV führte somit zu keiner messbaren B Zell-Antwort. In einem nächsten Schritt wurde die Verabreichungsrouten geändert und den Versuchstieren ca. 10^9 VLP-VSV *i.v.* injiziert. Erneut wurden die VSV-neutralisierenden Antikörpertiter an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. 140 Tage nach der ersten Injektion wurde den gleichen Tieren, dieselbe Dosis erneut verabreicht und die sekundäre B Zell-Antwort untersucht (Abb. 30). In WT-Tieren lässt sich nach ca. 4 Tagen ein deutlicher IgM-Titer nachweisen, der anschließend leicht abfällt. Nach ca. 8 Tagen weisen steigende IgG-Titer auf den Ig-Klassenwechsel hin. Obwohl der Antikörpertiter etwas schwächer ausfällt, zeigt sich, dass nichtreplizierende VLP-VSV fähig sind eine starke Thymus-unabhängige IgM-Antwort und den IgG-Klassenwechsel, ähnlich einer VSV-Infektion, zu induzieren. Die erneute Injektion von VLP-VSV nach 140 Tagen löst in WT-Tieren eine klassische, sekundäre Antikörperantwort aus, die hauptsächlich durch die Induktion von IgG gekennzeichnet ist und stärker als die Primärantwort ausfällt. In $LT\alpha^{-/-}$ Tieren löst die Gabe von VLP-VSV die Induktion einer IgM-Antwort aus, die leicht abgeschwächt ausfällt und anschließend keinen Wechsel zum IgG-Isotyp zur Folge hat. Auch die Revakzinierung (*boost*) nach 140 Tagen führt ausschließlich zu einer IgM-Antwort, welche, verglichen mit dem WT, schwächer ausfällt. Überraschenderweise lässt sich auch in $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$ Mäusen

ausschließlich eine abgeschwächte IgM-Antwort erzeugen, die nach erneuter Gabe von VLP-VSV ebenfalls nur der Primärantwort ähnelt. Der $LT\alpha^{-/-}$ Phänotyp kann in $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäusen, durch die Expression des LckLT $\alpha\beta$ -Transgens in T Zellen, nicht aufgehoben werden.

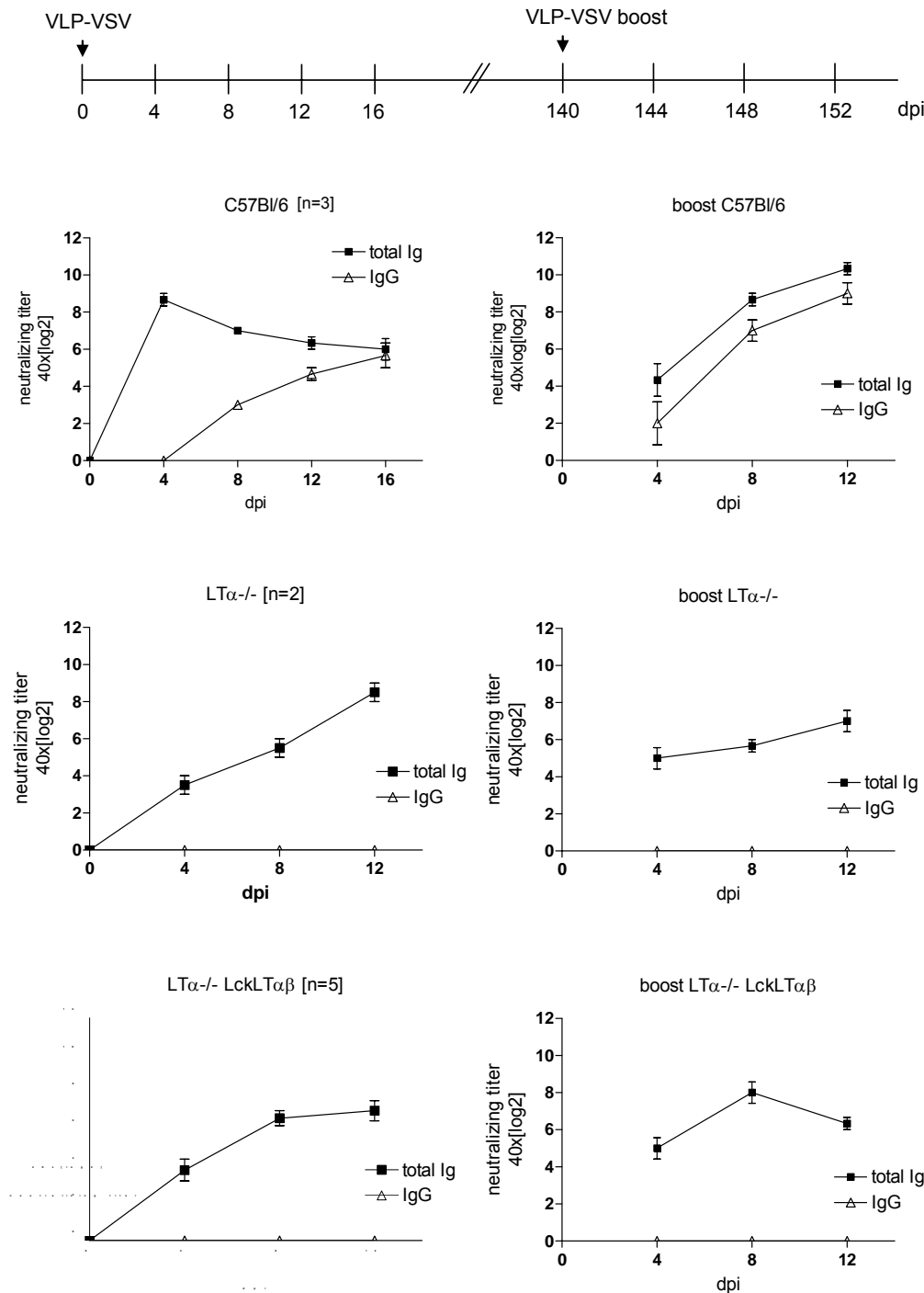


Abb. 30 Intravenöse Injektion von VLP-VSV erzeugt differenzierte B Zell-Antworten. WT, $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäuse wurden ca. 10^9 VLP-VSV *i.v.* injiziert. Anschließend wurde 4, 8, 12 und 16 Tage nach Injektion der Level an VSV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Nach 140 Tagen wurde eine gleiche Menge VLP-VSV injiziert und 4, 8 und 12 Tage später die Sekundärantwort an neutralisierenden Antikörpern gemessen. dpi – Tage nach Injektion.

8.2.2 Die Funktion von TRADD, einem neuen Faktor der TNF-Familie, bei der Virusabwehr

Lymphotoxin α und Tumornekrosefaktor α (TNF α) sind zwei Vertreter eines Zytokinsystems, der TNF/TNFR-Superfamilie, welche essentielle Funktionen in der Regulierung des Immunsystems übernehmen. TNF α wird dabei hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und ist in lokale und systemische Entzündungen involviert. TNF α regelt die Aktivität verschiedener Immunzellen, kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Es ist bekannt, dass nach Ablation von TNF α die Immunantwort gegen Pathogene beeinträchtigt ist. Studien in Mausmodellen zeigen, dass TNF α eine wichtige schützende Komponente bei bakteriellen Infektionen darstellt. So sind TNF α -knockout Mäuse (TNF $\alpha^{-/-}$) anfällig für Infektionen mit *M. tuberculosis*, *S. aureus* und *L. monocytogenes* (Pasparakis, M. *et al.*, 1996, Flynn, J. L. *et al.*, 1995, Hultgren, O. *et al.*, 1998). TNF kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden. TNFR1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und kann von der membrangebundenen Form, als auch vom dem löslichen TNF-Homotrimer aktiviert werden. TNFR2 wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert und kann nur durch das TNF-Homotrimer aktiviert werden. Nach Kontakt mit dem Liganden formen TNF-Rezeptoren Trimere, was zur Dissoziation des inhibitorischen Proteins SODD von der intrazellulären Todes-Domäne führt. Die anschließende Bindung des Adaptorproteins TRADD an die Todesdomäne ist der Initiator weiterer Proteinbindungen, welche diverse Signalfade aktivieren können. Dazu gehört u. a. die Aktivierung von nukleärem Faktor- κ B (NF- κ B) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), welche an entscheidenden immunmodulatorischen Prozessen teilhaben (Wajant, H. *et al.*, 2003, Chen, G. und Goeddel, D. V., 2002).

Um die Rolle von TNF α und TRADD auf die Immunantwort nach einer Virusinfektion zu untersuchen wurden TNF $\alpha^{-/-}$ und TRADD $^{-/-}$ Mäuse intravenös mit VSV infiziert und anschließend deren Überlebensraten und VSV-neutralisierende Antikörpertiter bestimmt. Weiterhin wurde die Menge an Virus-induziertem Interferon β (IFN β), einem in der frühen Phase der Immunantwort entscheidendem Zytokin, bestimmt.

8.2.2.1 Einfluss des TRADD- oder TNF α -knockouts auf die Immunantwort nach VSV-Infektion

Mäuse mit den Genotypen TRADD^{-/-} (Ermolaeva, M. A. *et al.*, 2008) und TNF α ^{-/-} wurden freundlicherweise von Dr. Manolis Pasparakis, Universität Köln, bereitgestellt. Zunächst wurde untersucht, ob TNF α ^{-/-} und TRADD^{-/-} Mäuse eine, im Vergleich zu WT-Mäusen, veränderte Überlebensrate nach einer Virusinfektionen aufweisen. Hierzu wurden die Versuchstiere mit 2×10^6 bzw. 2×10^8 pfu VSV *i.v.* infiziert (Abb. 31).

Sowohl TRADD^{-/-}, als auch TNF α ^{-/-} Mäuse zeigen bei einer Dosis von 2×10^6 pfu VSV, keine signifikant erhöhte Mortalität gegenüber WT-Tieren. Bei Erhöhung der Infektionsdosis auf 2×10^8 pfu VSV kann die Infektion bei WT-Tieren kaum noch unter Kontrolle gebracht werden. Allerdings erwiesen sich TRADD^{-/-} und besonders TNF α ^{-/-} Mäuse als sensitiv gegen hohe Dosen an VSV, da hier mehr als 50% (TRADD^{-/-}) und bis zu 75% (TNF α ^{-/-}) der Versuchstiere verstarben.

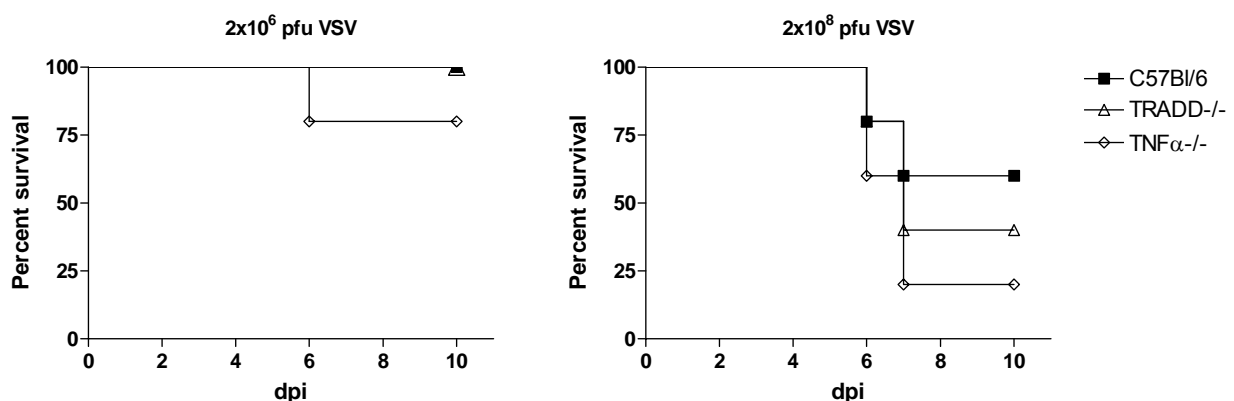


Abb. 31 Grafische Darstellung der Überlebensraten nach intravenöser Infektion der Versuchstiere mit VSV. C57Bl/6, TRADD^{-/-} und TNF α ^{-/-} Tiere wurden mit 2×10^6 bzw. 2×10^8 pfu VSV *i.v.* infiziert [n=5] und die prozentualen Überlebensraten über die Zeit aufgezeichnet. Eine Dosis von 2×10^6 pfu VSV wurde von allen Genotypen gut toleriert, wohingegen bei Erhöhung der Infektionsdosis auf 2×10^8 pfu eine erhöhte Sensitivität der TRADD^{-/-} und TNF α ^{-/-} Tiere, gegenüber dem WT, festzustellen ist. dpi – Tage nach Infektion.

Um den Einfluss des TNF α und TRADD-*knockouts* auf die Induktion von B Zell-Antworten zu untersuchen, wurde der Serumtiter an VSV-neutralisierenden Antikörpern aus VSV-infizierten WT-, TNF α ^{-/-} und TRADD^{-/-} Tiere bestimmt. Wie in Abb. 32 gezeigt wird, ließen sich nach wenigen Tagen in allen untersuchten Genotypen und unabhängig von der

Infektionsdosis, rasch ansteigende neutralisierende Antikörpertiter vom IgM-Isotyp nachweisen. Nach ca. 8 Tagen fand in allen Versuchsgruppen der Isotypwechsel zu IgG statt. Weder funktional, noch kinetisch konnten 12 Tage nach Infektion mit VSV, Unterschiede in den primären B Zell-Antworten von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$, $\text{TRADD}^{-/-}$ oder WT-Tieren beobachtet werden.

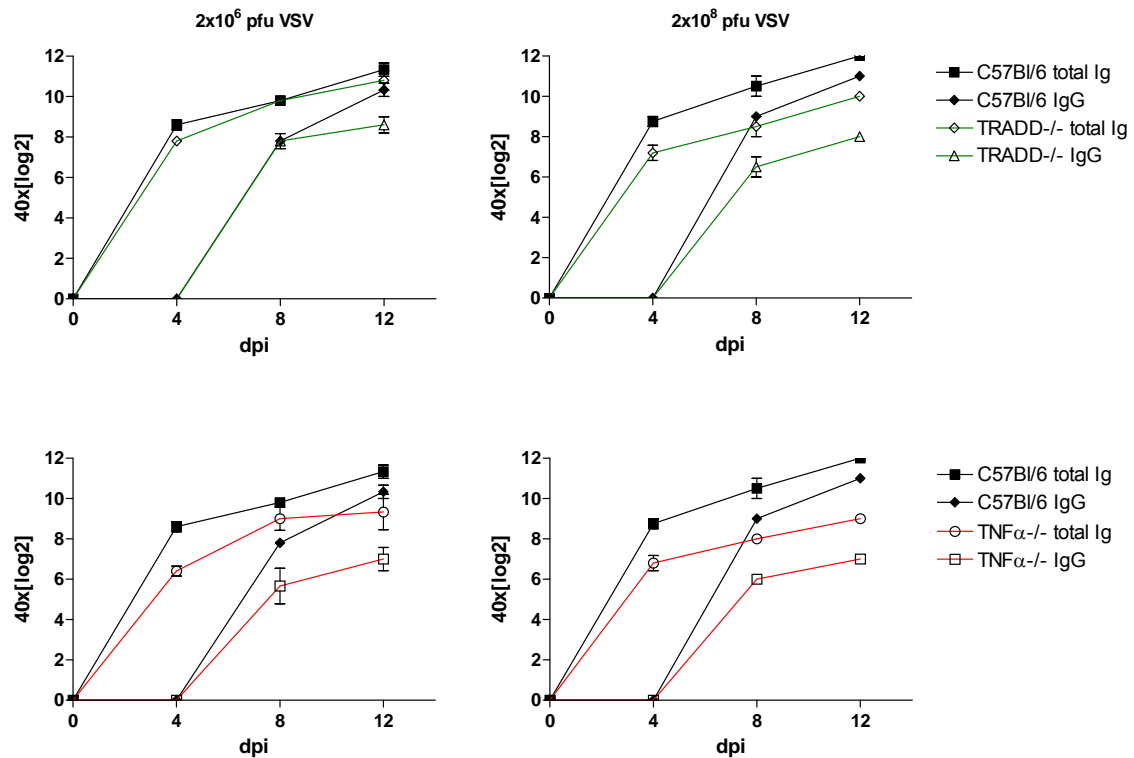


Abb. 32 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach intravenöser VSV-Infektion. C57Bl/6, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TRADD}^{-/-}$ Tiere [n=5] wurden mit 2×10^6 bzw. 2×10^8 pfu VSV *i.v.* infiziert. Der Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde aus dem Serum der Versuchstiere bestimmt. In allen Tieren kam es ca. 4 Tage nach Infektion zur Ausbildung einer starken IgM-Antwort. Anschließend ließ sich nach ca. 8 Tagen der Isotypwechsel zu IgG nachweisen. dpi – Tage nach Infektion.

Nach Infektion mit VSV produzieren Zellen des Immunsystems, besonders plasmazytoide dendritische Zellen, große Mengen an Type I Interferonen, wie z. B. Interferon- β . Die Expression der Interferone geschieht dabei sehr früh nach einer Infektion. Der Einfluss eines gestörten Interferonsystems auf die Fähigkeit die Infektion zu kontrollieren, wurde zuvor schon verdeutlicht (Abb. 26 und Abb. 34). Um einen Einfluss des $\text{TNF}\alpha$ - und TRADD -*knockouts* auf die Induktion dieser antiviralen Zytokine zu untersuchen, wurde die Menge an gebildetem IFN β aus dem Serum der infizierten Tiere bestimmt (Abb. 33). WT-Tiere zeigten dabei 24 h nach Infektion hohe IFN β Mengen. Im Gegensatz dazu ließ sich nach einer

Infektion 2×10^6 pfu VSV in $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ Tieren kein $\text{IFN}\beta$ im Serum nachweisen. Ebenso war in $\text{TRADD}^{-/-}$ Tieren eine starke Reduktion der $\text{IFN}\beta$ Expression feststellbar.

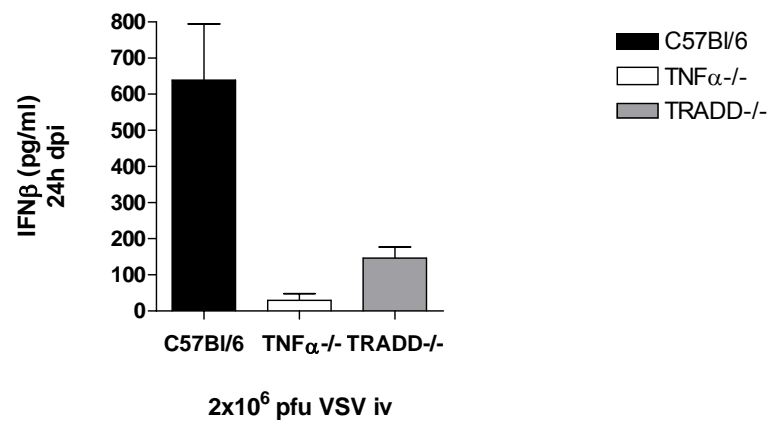


Abb. 33 Konzentration an $\text{IFN}\beta$ im Serum, 24 Stunden nach intravenöser Infektion mit VSV. C57Bl/6, $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TRADD}^{-/-}$ Mäuse [n=5] wurden mit 2×10^6 pfu VSV i.v. infiziert. Die Konzentration an gebildetem $\text{IFN}\beta$ wurde aus dem Serum der Versuchstiere bestimmt. WT-Tiere zeigten eine hohe $\text{IFN}\beta$ Expression, während die Produktion $\text{IFN}\beta$ in $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TRADD}^{-/-}$ Mäusen stark vermindert ist.

8.2.3 Der Einfluss von Typ I Interferon auf myeloiden Zellen bei der Eliminierung von Virusinfektionen

8.2.3.1 Der Einfluss von Typ I Interferonen in myeloiden Zellen bei der Kontrolle von Virusinfektionen

Interferone sind wichtige Komponenten der frühen Immunantwort um Virusinfektionen entgegenzuwirken. Interferonrezeptor-defiziente Mäuse (IFNAR^{-/-}) sind hoch anfällig gegenüber Infektionen mit verschiedenen Viren (Muller, U. *et al.*, 1994). Dies konnte hier bestätigt werden, da die Injektion von 10³ pfu VSV intranasal, zum Versterben von IFNAR^{-/-} Mäusen nach 2-3 Tagen führte, während WT-Mäuse keinerlei Anzeichen einer Virusinfektion zeigten (Abb. 34). Um zum Verständnis des Einflusses von Typ I Interferonen auf einzelne

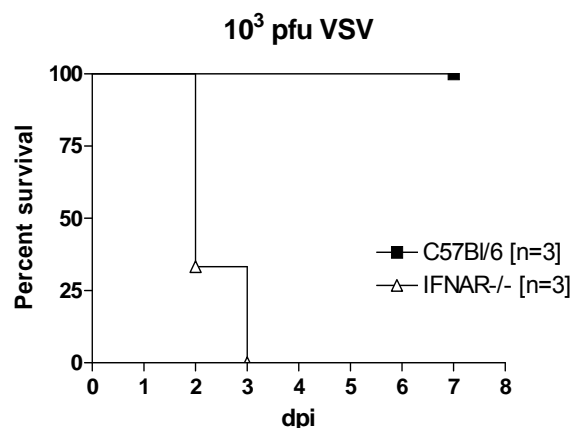


Abb. 34 Intranasale Infektion von IFNAR^{-/-} Mäusen mit VSV. Mäuse ohne funktionales Interferonsystem verstarben nach 2-3 Tagen durch geringe Mengen VSV, während WT-Tiere in der Lage waren die Infektion unter Kontrolle zu bringen.

Zelltypen beizutragen, können Mauslinien mit konditionellem IFNAR-*knockout* verwendet werden. Ulrich Kalinke entwickelte dafür ein Mausmodell, das es ermöglicht den Interferonrezeptor gewebespezifisch zu deletieren. Hierfür wurde zunächst eine Mauslinie hergestellt, in der das Exon 10 der IFNAR- α -Kette von loxP-Sequenzen flankiert (IFNAR^{fllox/fllox}) wird. In dieser Mauslinie kann durch Verkreuzen, mit einer entsprechenden Cre-exprimierenden Mauslinie, der Interferonrezeptor gewebespezifisch oder ubiquitär deletiert werden (Kamphuis, E. *et al.*, 2006; Bach, P. *et al.*, 2007). Aus dem Verkreuzen von IFNAR^{fllox/fllox} mit einer Mauslinie die das Enzym Cre-Rekombinase unter dem murinen

Lysozym M-Promoter (LysMcre) exprimieren (Clausen, B. E. *et al.*, 1999), entstand eine neue Mauslinie (LysMcre-IFNAR^{lox/lox}), in der der Interferonrezeptor auf myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und myeloiden dendritischen Zellen (mDC) deletiert ist (König, M. *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Welchen Einfluss das Interferonsystem dieser Zellen auf die Immunantworten gegenüber Virusinfektionen hat, wurde nachfolgend untersucht.

8.2.3.2 Deletion des IFN-Rezeptors in myeloiden Zellen der LysMcre-IFNAR^{lox/lox} Mauslinie

Zur Charakterisierung der LysMcre induzierten IFNAR-Deletion wurden Peritonealzellen aus LysMcre-IFNAR^{lox/lox}, IFNAR^{-/-} und C57BL/6 Mäusen präpariert und mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert. Die IFNAR-Expression wurde jeweils auf F4/80⁺, MOMA1⁺ und MOMA2⁺ Zellen ermittelt, welche als Differenzierungsmarker für reife Makrophagen dienen. Zur Quantifizierung der IFNAR-Expression auf unterschiedlichen Makrophagen-Typen wurde die prozentuale Expression der jeweiligen Zellen berechnet (siehe 7.19.5.2). Die höchste Deletionseffizienz zeigten F4/80⁺/CD11c⁺ Zellen mit einer nicht mehr feststellbaren IFNAR-Expression. MOMA1⁺ Makrophagen deletierten den IFN-Rezeptor zu 98% und MOMA2⁺ Zellen zu 94%. Die IFNAR-Expression auf Lymphozyten von LysMcre-IFNAR^{lox/lox} Mäusen war dabei, wie erwartet, nicht betroffen.

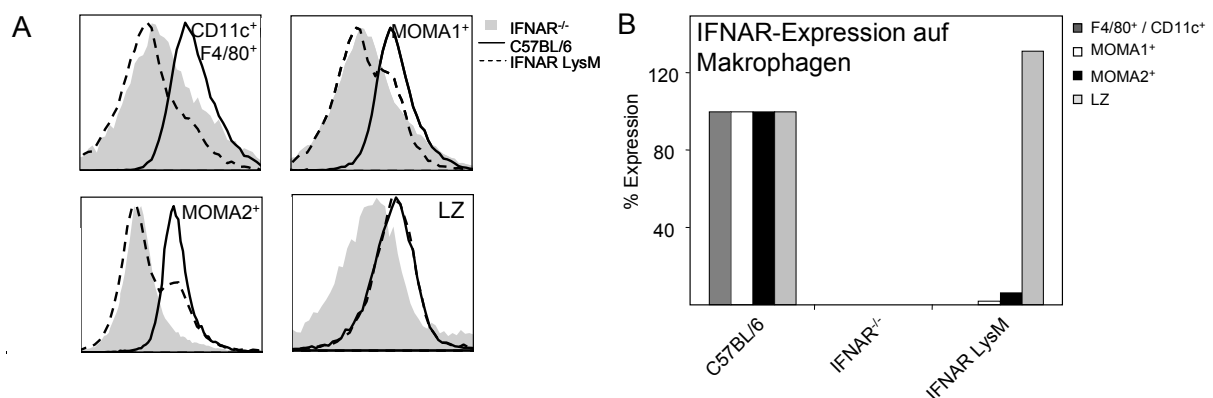


Abb. 35 IFNAR-Expression auf Subtypen von peritonealen Makrophagen. **A** Analyse der Expression des IFN-Rezeptors auf peritonealen Zellen mittels FACS. Gezeigt sind die Histogramme der IFNAR-Färbung verschiedener Makrophagen-Subtypen und Lymphozyten (LZ) von IFNAR^{-/-} (grau), C57BL/6 (geschlossen) und LysMcre-IFNAR^{lox/lox} (gestrichelt). **B** Berechnung der spezifischen IFNAR- Expression von F4/80⁺/CD11c⁺ -, MOMA1⁺ - und MOMA2⁺ -Makrophagen, sowie der Lymphozytenpopulation.

8.2.3.3 *LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäuse sind sensitiver für Infektionen mit VSV*

Um zu untersuchen, ob *LysMcre-IFNAR^{flx/flx}* Mäuse, im Vergleich zu WT-Mäusen, einen veränderten Krankheitsverlauf nach einer VSV-Infektion aufweisen, wurden die Versuchstiere *i.v.* oder *i.n.* mit VSV infiziert und deren Überlebensraten aufgezeichnet (Abb. 36, Abb. 37). Wie bereits zuvor gezeigt sind WT-Mäuse, ebenso wie *IFNAR^{flx/flx}* Mäuse, in der Lage eine intravenöse Dosis von bis zu 2×10^7 pfu zu tolerieren und verstarben erst ab einer Dosis von 2×10^8 pfu VSV mehrzählig. *LysMcre-IFNAR^{flx/flx}* Mäuse zeigten bereits ab einer Dosis von 2×10^6 pfu eine höhere Sensibilität gegenüber VSV und waren ab einer Dosis von 2×10^7 pfu nicht mehr in der Lage die Virusinfektion unter Kontrolle zu bringen (Abb. 36). Die Tiere verstarben nach 6-10 Tagen an den Folgen der Infektion.

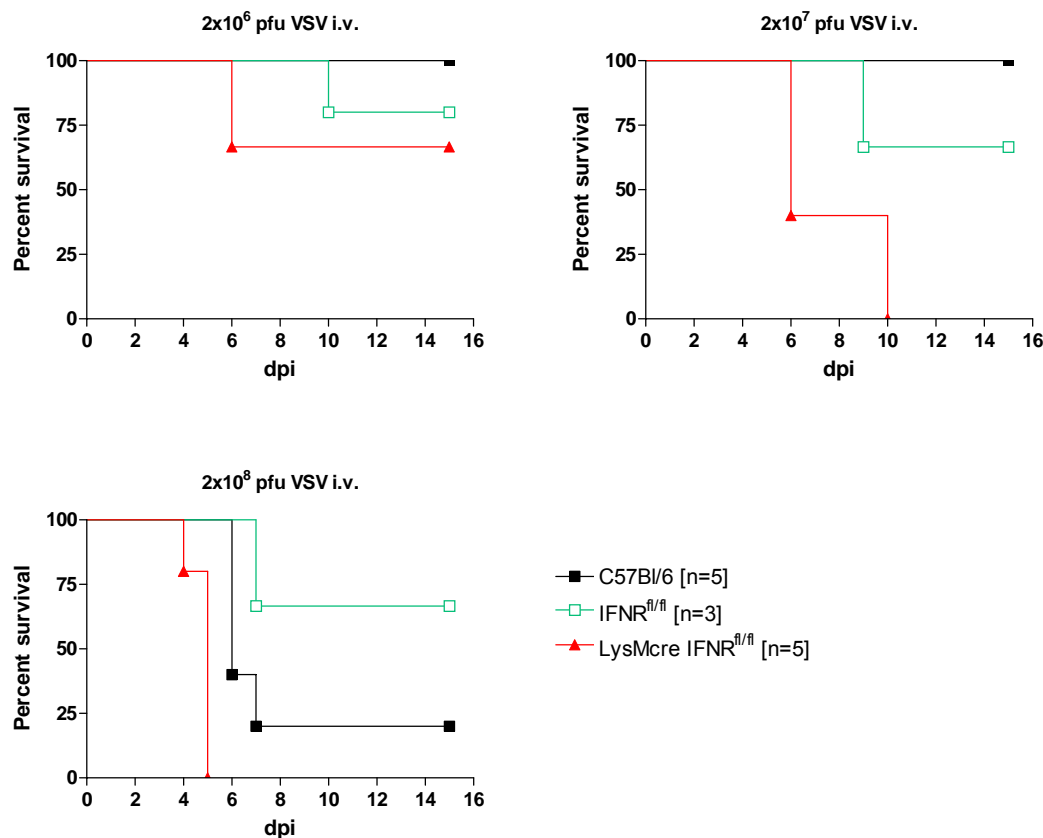


Abb. 36 *LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäuse sind sensitiver für mittlere und hohe Dosen intravenös injiziertem VSV.* Grafische Darstellung der Überlebensraten der Versuchstiere. C57Bl/6, *IFNAR^{flx/flx}* und *LysMcre-IFNAR^{flx/flx}* wurden mit 2×10^6 – 2×10^8 pfu VSV *i.v.* infiziert und die prozentualen Überlebensraten über die Zeit aufgezeichnet. Eine Dosis von 2×10^6 pfu VSV konnte von allen Genotypen gut kontrolliert werden, wohingegen die Erhöhung der Infektionsdosis auf 2×10^7 pfu von *LysMcre-IFNAR^{flx/flx}* Tieren nicht mehr toleriert wurde. Die Grafik zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment. dpi – Tage nach Infektion.

Die intravenöse Gabe von VSV dirigiert das Antigen vornehmlich in die Milz, wo eine starke Immunantwort ausgelöst wird. Um den Einfluss von Typ I Interferonen nach einer peripheren Infektion zu untersuchen, die VSV-Antigene zunächst zum drainierenden Lymphknoten oder in die mukosalen lymphoiden Gewebe führt, wurden Versuchstiere intranasal mit einer Dosis von 2×10^3 - 2×10^5 pfu infiziert. WT-Tiere und $\text{IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ Mäuse zeigten nach der Infektion mit 2×10^3 pfu VSV keinerlei Symptome, verstarben aber bei Erhöhung der Dosis auf 2×10^4 bzw. 2×10^5 pfu VSV. $\text{LysMcre-IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ Mäuse waren kaum in der Lage die geringe Dosis von 2×10^3 pfu VSV zu tolerieren (Abb. 37). Sie verstarben mehrheitlich nach 6-14 Tagen, ebenso bei allen höheren, verabreichten Dosen.

Sowohl nach intravenöser, als auch nach intranasaler Infektion mit VSV, erscheinen $\text{LysMcre-IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ Mäuse für eine Virusinfektion deutlich sensibler, als der Wildtyp.

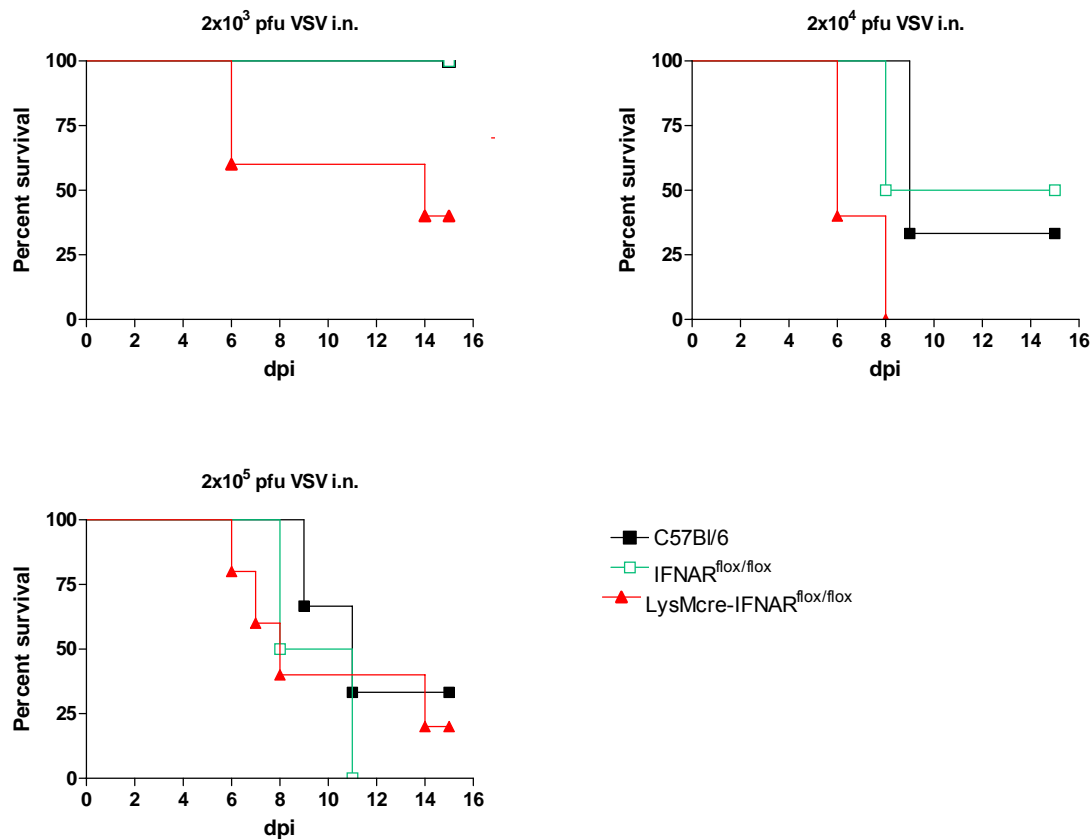


Abb. 37 $\text{LysMcre-IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ Mäuse sind sensitiv für geringe Dosen intranasal injiziertem VSV. Grafische Darstellung der Überlebensraten der Versuchstiere. C57Bl/6, $\text{IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ und $\text{LysMcre-IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ [n=3-5] wurden mit 2×10^3 – 2×10^5 pfu VSV i.n. infiziert und die prozentualen Überlebensraten über die Zeit aufgezeichnet. Eine Dosis von 2×10^3 pfu VSV wurde von C57Bl/6 und $\text{IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ toleriert, wohingegen $\text{LysMcre-IFNAR}^{\text{lox/lox}}$ Mäuse die Infektion nicht unter Kontrolle bringen konnten und verstarben. Die Grafik zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment. dpi – Tage nach Infektion.

8.2.3.4 *LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäuse zeigen normale B Zell-Antworten nach einer VSV-Infektion*

Um den Einfluss des IFNAR-*knockouts* in myeloiden Zellen auf die Induktion von B Zell-Antworten zu untersuchen, wurden WT, IFNAR^{flx/flx} und LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Tiere mit der subletalen Dosis von 2×10^6 pfu VSV *i.v.* infiziert und der Serumtiter an VSV-neutralisierenden Antikörpern, an den Tagen 4, 8 und 12 nach Infektion bestimmt. Wie in Abb. 38 gezeigt wird, lassen sich nach wenigen Tagen in allen untersuchten Genotypen, rasch ansteigende neutralisierende IgM-Titer nachweisen. Nach ca. 8 Tagen lässt sich in allen Versuchsgruppen der Isotypwechsel zu IgG feststellen. Gleichartige Resultate konnten bei einer Dosis von 2×10^7 pfu VSV festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das nicht-funktionale Interferonsystem in den myeloiden Zellen von LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäusen, scheint somit keinen Einfluss auf die primären B Zell-Antworten gegen VSV zu haben.

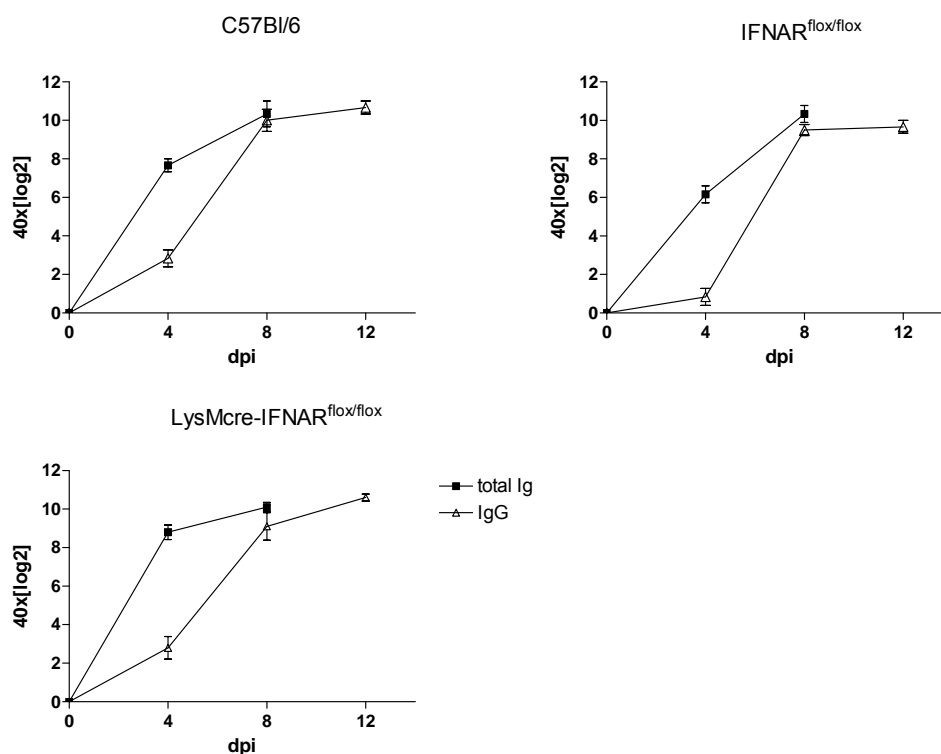


Abb. 38 Bestimmung der neutralisierenden Antikörpertiter nach subletaler VSV-Infektion. C57Bl/6, IFNAR^{flx/flx} und LysMcre-IFNAR^{flx/flx} wurden mit 2×10^6 pfu VSV *i.v.* infiziert [n=3-5]. Der Titer an VSV-neutralisierenden Antikörpern wurde aus dem Serum der Versuchstiere bestimmt. In allen Tieren kommt es ca. 4 Tage nach Infektion zur Ausbildung einer IgM-Antwort. Anschließend lässt sich nach ca. 8 Tagen der Isotypwechsel zu IgG nachweisen. dpi – Tage nach Infektion.

8.2.3.5 *LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse zeigen einen erhöhten Virustiter und einen veränderten Tropismus nach VSV Infektion*

LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse sind trotz normaler B Zell-Antworten sensibler für eine VSV-Infektion. Zur Analyse des Virustropismus und des Virustiters, wurden LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse mit VSV infiziert und die Virustiter in verschiedenen Organen der Versuchstiere bestimmt. C57Bl/6, IFNAR^{flox/flox} und LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse wurden dazu zunächst mit 2×10^7 pfu VSV i.v. infiziert. Anschließend wurden nach 12, 24, 48 und 144 h (6 Tagen) jeweils 3 Mäuse pro Genotyp getötet, die Organe präpariert und die VSV-Titer pro Gramm Gewebe bestimmt (Abb. 39). In WT- und IFNAR^{flox/flox}-Tiere konnte VSV 12 h nach Infektion in der Milz und der Leber, in geringen Mengen, nachgewiesen werden. Nach 24 h war VSV aus diesen Organen der Tiere eliminiert. In alle weiteren untersuchten Organen konnten zu keinem Zeitpunkt VSV nachgewiesen werden. In LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen ließen sich sowohl stark erhöhte Virustiter, als auch ein veränderter Tropismus nachweisen. In der Milz, der Lunge und der Leber von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen war, im Vergleich zum WT, ein stark erhöhter Virustiter messbar. Des Weiteren konnte das Virus auch 48 h nach Infektion in hohen Mengen nachgewiesen werden, bevor es nach 144 h auch von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen eliminiert werden konnte. Ausschließlich in LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen konnte 48 h nach Infektion die Infiltration von VSV ins Gehirn nachgewiesen werden. Dort stieg der Virustiter bis zum Exitus der Versuchstiere stark an.

Somit lassen sich in LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen deutlich höhere VSV-Titer und eine stark verzögerte Eliminierung des Virus nachweisen. Zusätzlich zeigt VSV einen veränderten Tropismus ins Gehirn der Versuchstiere, der nicht zu kontrollieren scheint.

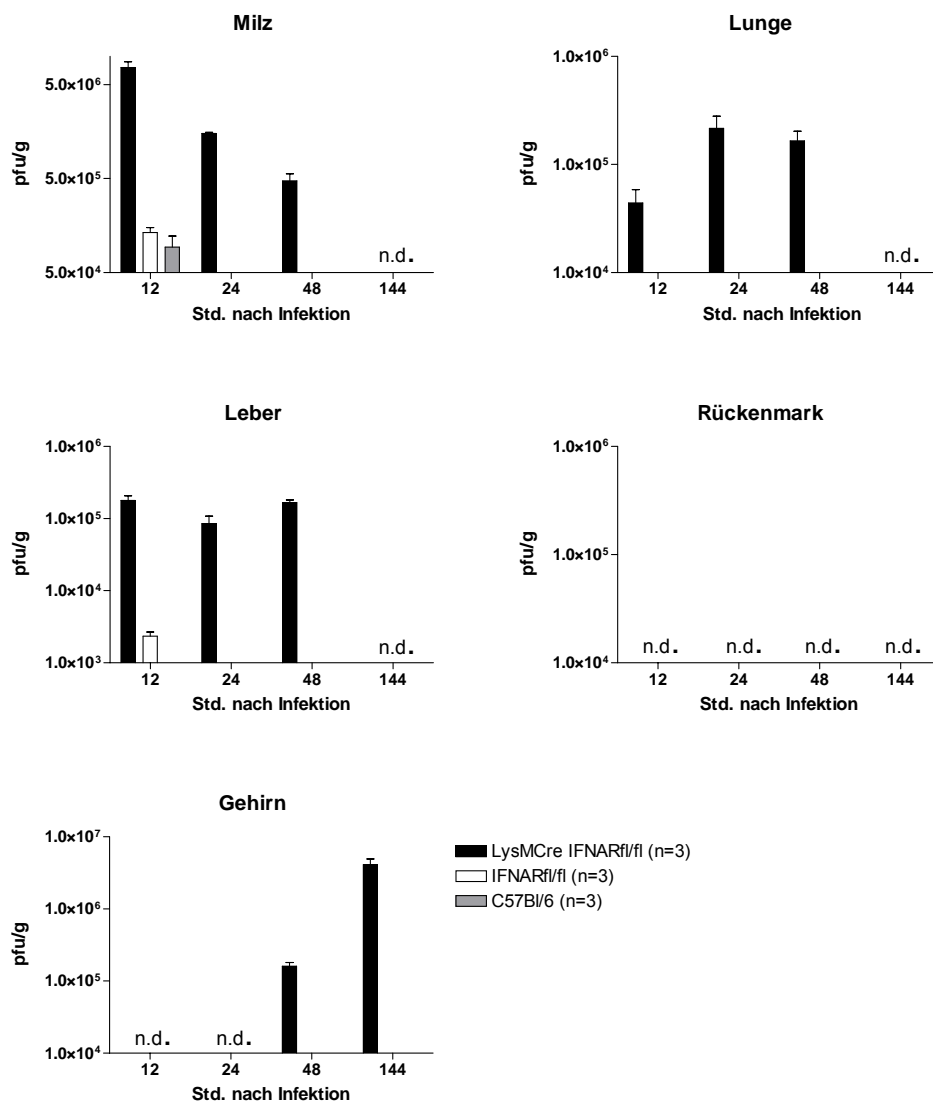


Abb. 39 Bestimmung der Viruslast verschiedener Organe nach Infektion mit VSV. C57Bl/6, IFNAR^{flox/flox} und LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse wurden mit 2×10^7 pfu VSV *i.v.* infiziert. Nach 12, 24, 48 und 144 h wurden 3 Mäuse pro Genotyp getötet, die Organe präpariert und die VSV-Titer/g Gewebe bestimmt. Während WT-Tiere das Virus in kürzester Zeit eliminierten, ließ es sich in LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen auch 48 h nach Infektion in peripheren Organen nachweisen. Des Weiteren infiltrierte VSV, ausschließlich und mit ansteigendem Titer, die Gehirne von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen. n.d. – nicht detektierbar

8.3 Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ

Interferone werden gewöhnlich auf Grund ihrer Rezeptor-Spezifität und ihrer Sequenz-Homologie klassifiziert. Während verschiedene Zytokine den Typ I Interferone zugeordnet werden, ist IFN γ das einzige Zytokin welches als Typ II Interferon bezeichnet wird. IFN γ zeigt strukturell keine Ähnlichkeit mit Typ I Interferonen und bindet spezifisch an den Interferon- γ Rezeptor (IFNGR). IFN γ wird hauptsächlich von T Zellen, Makrophagen, NK Zellen und dendritischen Zellen gebildet und ist ein pleiotropes Zytokin, das an einer Vielzahl von immunmodulatorischen Prozessen beteiligt ist. In Infektionsstudien konnte belegt werden, dass IFN $\gamma^{-/-}$ und IFNGR1 $^{-/-}$ Mäuse Defizite in der natürlichen Resistenz gegen bakterielle, parasitäre und virale Infektionen zeigen (Huang, S. *et al.*, 1993; van den Broek, M. F. *et al.*, 1995; Buchmeier, N. A. *et al.*, 1995).

Um die Rolle des von unterschiedlicher Zelltypen gebildeten IFN γ in der Immunabwehr von Pathogenen zu untersuchen, soll hierzu ein neues Mausmodell generiert werden, in dem eine Zelltyp-spezifische Rekonstitution der IFN γ Expression ermöglicht wird. Hierzu wurde eine definierte Mutation im IFN γ Locus von murinen ES Zellen, mittels zielgerichteten Mutagenese (*Gene-Targeting*) durchgeführt (vgl. Kap. 8.1). Das klonierte Targeting-Konstrukt (Dr. Zoe Waibler und Sven Flindt, unpubliziert), soll nach Insertion in den genomischen Locus die Expression von IFN γ unterbinden (Abb. 41). Zu diesem Zweck enthält der Targeting-Vektor eine durch loxP-Sequenzen flankierte promoterlose TRAP-Kassette (Dr. Klaus Pfeffer, Universität Düsseldorf, unpubliziert). Die Insertion dieser Kassette in den intronischen Bereich zwischen Exon 1 und 2 des genomischen Locus, führt auf dem entsprechenden Allel zu einer Inhibition der IFN γ Expression.

Darüber hinaus enthält die TRAP-Kassette das Reportergen *lacZ*, welches für das Enzym β -Galactosidase kodiert und nach homologer Rekombination unter die Kontrolle des IFN γ Promoters gelangt. β -Galactosidase ist in der Lage die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und dem blauen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo zu katalysieren. Das Expressionsmuster von IFN γ in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben kann somit durch Nachweis dieses Farbstoffs analysiert werden. In homozygot transgenen Tieren ist die IFN γ Expression vollständig unterbrochen. Die Zell- bzw. Gewebe-spezifische Expression von IFN γ kann durch Verkreuzung mit verschiedenen konditionell Cre-exprimierenden Mäusen erreicht werden

(Abb. 41, Abb. 42). Die Expression von Cre-Rekombinase vermittelt *in vivo* die intramolekulare Rekombination zur Deletion der loxP-flankierten TRAP-Kassette, so dass die Inhibition der IFN γ Expression aufgehoben wird.

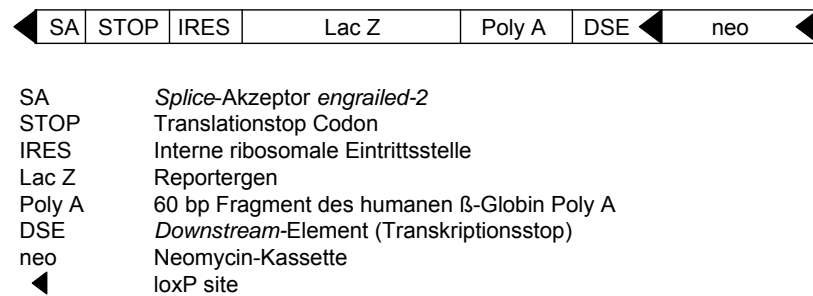


Abb. 40 Schematische Darstellung der verwendeten TRAP-Kassette. Die Insertion der TRAP-Kassette in den genomischen IFN γ Locus führt zum Expressionsstop. Stattdessen gelangt *lacZ* unter Kontrolle des IFN γ Promoters. Die Neomycin-Resistenz-Kassette dient zur Selektion homolog rekombinierter ES Zell-Klone und kann durch transiente Expression von Cre-Rekombinase entfernt werden.

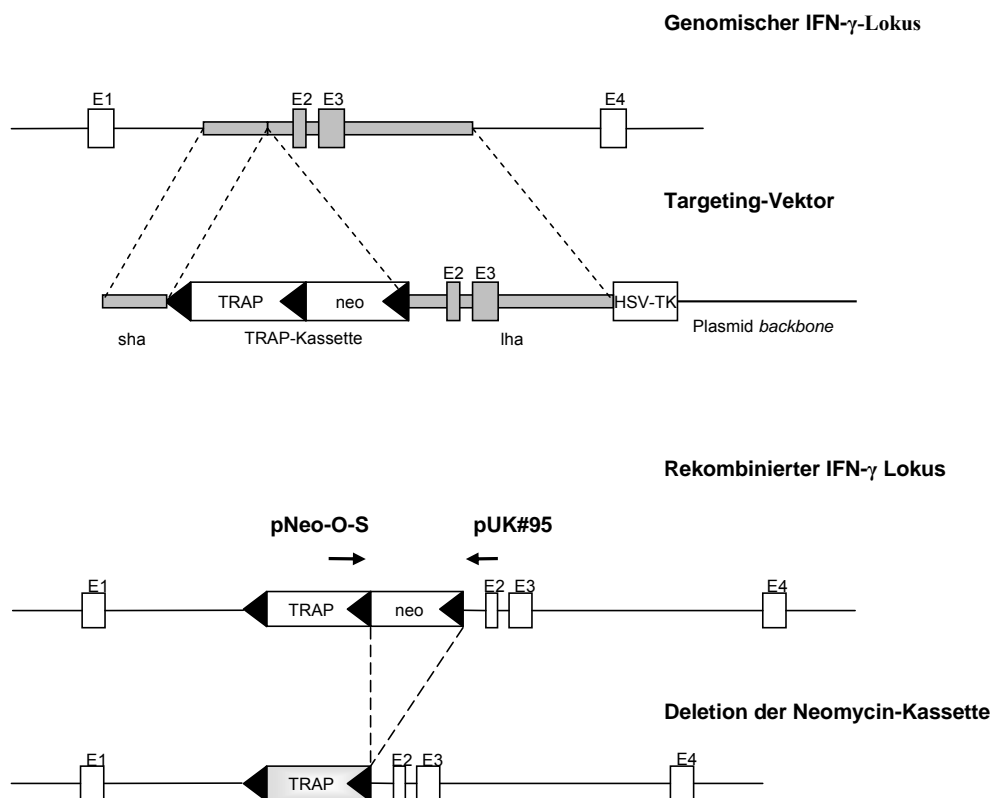


Abb. 41 Targeting Strategie für die Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ . Die durch loxP-sites flankierte TRAP/Neomycin-Kassette wurde mittels homologer Rekombination in den intronischen Bereich zwischen Exon 1 und 2 des genomischen IFN γ Locus integriert. Durch transiente Cre-Expression wurde die Neomycin-Resistenz-Kassette aus positiven ES Zell-Klonen deletiert.

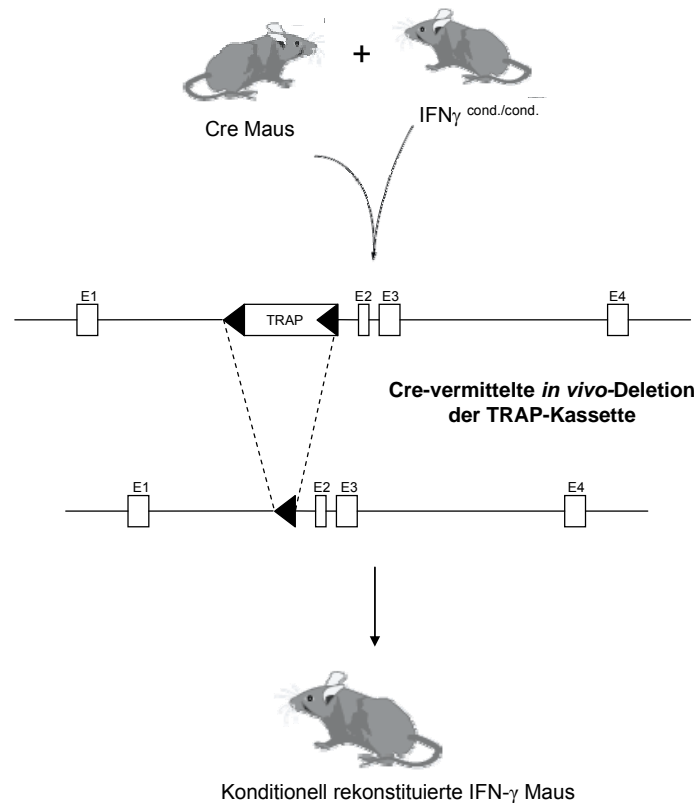
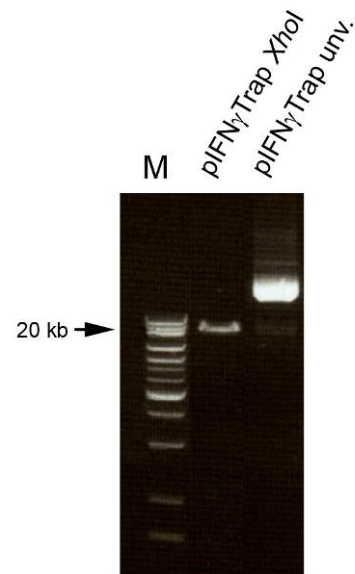


Abb. 42 Expression von Cre-Rekombinase vermittelt die konditionelle Expression von IFN γ . Homozygot transgene IFN $\gamma^{cond./cond.}$ Tiere können mit konditionell Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen verpaart werden. Dies führt zur *in vivo* Deletion der TRAP-Kassette und anschließenden Expression von IFN γ

8.3.1 Targeting von murinen embryonalen Stammzellen

Für jede Elektroporation von murinen ES Zellen, wurden 10 μ g des ~ 20 kb großen Targeting-Vektors mit *Xho*I linearisiert (Abb. 43). *Xho*I ist eine unique Restriktionsschnittstelle und befindet sich am 3'-Ende des kurzen homologen Arms. Nach der Elektroporation wurden die ES Zellen in Zellkulturschalen auf einen Zellrasen von MEFs ausgesät. Nach 24 h wurde dem ES-Zell-Medium Geneticin[®] (G418) als positiver Selektionsmarker zugesetzt. 48 h nach der Elektroporation wurde zusätzlich der negative Selektionsmarker Cymevene[®] zugegeben. Nach 10-12 Tagen wurden die überlebenden ES Zell-Klone isoliert und vereinzelt weiter kultiviert. Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in den genomischen IFN γ Locus wurde durch eine spezifische *screening*-PCR überprüft (siehe 8.3.2).

Abb. 43 Linearisierung des Targeting-Vektors mit *XhoI*. Je 10 µg des Targeting-Vektors pIFN γ Trap wurden mit *XhoI* restringiert und zur Elektroporation von ES Zellen verwendet. Die vollständige Restriktion wurde mit 100 ng geschnittener Vektor-DNA im Agarosegel überprüft. M, Marker



8.3.2 Screening und Identifikation von homolog rekombinierten Stammzellklonen

Zur Identifikation von positiven ES Zell-Klonen, die das Targeting-Konstrukt im IFN γ -Lokus integriert haben, wurde eine spezifische *screening*-PCR verwendet. Der Primer p#170 bindet hierbei innerhalb der TRAP-Kassette, während der Primer p#168 innerhalb des intronischen Bereichs, *downstream* von IFN γ Exon 1, bindet (Abb. 44). Zur Etablierung der *screening*-PCR wurde auf einen bereits existierenden *mimic*-Klon zurückgegriffen (Dr. Zoe Waibler, unpubliziert). Die genomische Konstellation des *mimic*-Klons imitiert die Verhältnisse im IFN γ Lokus nach erfolgreicher homologer Rekombination, sodass dieser für die Etablierung der *screening*-PCR verwendet werden konnte.

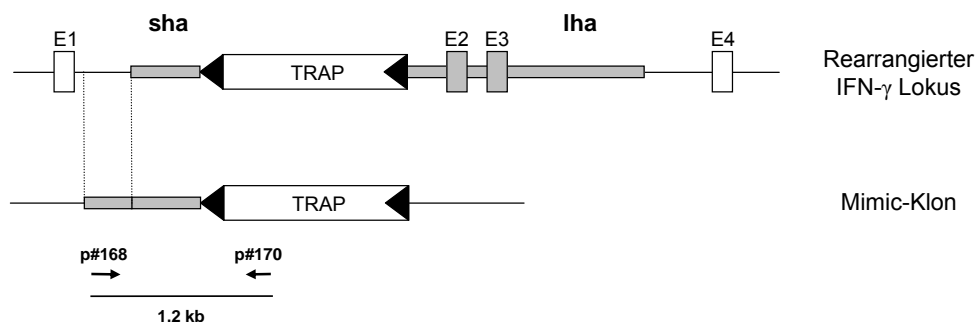


Abb. 44 Homolog rekombinierte ES-Zell-Klonen wurden durch PCR identifiziert. Der mutierte IFN γ -Lokus und der für die PCR wichtige Bereich des verwendeten *mimic*-Klons sind schematisch dargestellt. In positiven ES Zell-Klonen erzeugt das Primerpaar p#168 / p#170 ein 1,2 kb großes PCR-Produkt. Zur Etablierung der *screening*-PCR wurde der *mimic*-Klon verwendet. sha – kurzer homologer Arm, lha – langer homologer Arm, E1-E4 – IFN γ Exon 1-4, schwarze Dreiecke, loxP-Sequenzen

Um die Nachweisgrenze eines positiven ES Zell-Klons unter mehreren negativen ES Zell-Klonen zu bestimmen, wurde die genomische DNA von 1 positiven *mimic*-Klon und 7 negativen ES Zell-Klonen, bzw. 1 positiven und 16 negativen ES Zell-Klonen vereinigt (*gepoolt*) und in der *screening*-PCR eingesetzt. Wie aus Abb. 45 ersichtlich wird, konnte ein *mimic*-Klon in 8 bzw. 16 unabhängigen ES Zell-Klonen per PCR identifiziert werden. Somit war es möglich bis zu 16 ES Zell-Klone zu vereinen und mit einer einzigen PCR zu analysieren.

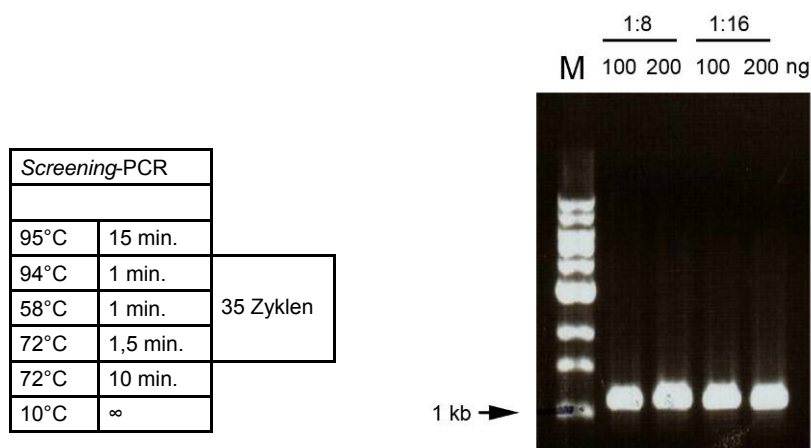


Abb. 45 Etablierung der *screening*-PCR. In 8er- und 16er-*pools* konnte jeweils ein *mimic*-Klon mittels PCR nachgewiesen werden. Positive ES Zell-Klone erzeugen ein 1,2 kb großes PCR-Produkt. In negativen ES Zell-Klonen ist dieses Fragment nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Zur PCR wurden entweder 100 oder 200 ng genomische DNA eingesetzt. M - Marker

Die genomische DNA von jeweils 8 isolierten ES Zell-Klonen wurden vereint und in der *screening*-PCR eingesetzt. Positive *pools*, konnten durch PCR und anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Identifikation von positiven ES Zell-Klonen innerhalb eines *pools*, wurde genomische DNA der Einzelnen, im jeweiligen *pool* vorhandenen, ES Zell-Klone präpariert und die *screening*-PCR erneut durchgeführt. Insgesamt konnten somit 4 unabhängige Stammzellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt, durch homologe Rekombination, in den IFN γ -Lokus integriert haben (Abb. 46).

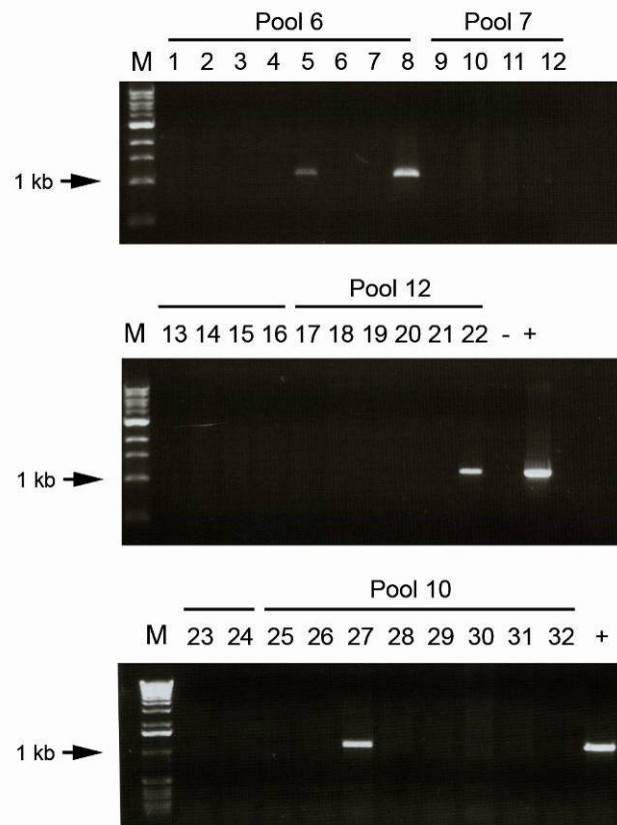


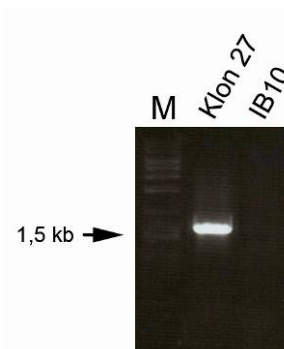
Abb. 46 Identifikation von positiven ES Zell-Klonen mittels PCR. Genomische DNA der gepickten ES Zell-Klone wurde in der *screening*-PCR eingesetzt. Positive Klone ließen sich durch eine 1,2 kb große Bande im Agarosegel nachweisen. Insgesamt 4 unabhängige ES Zell-Klone, die das Targeting-Konstrukt in den IFN γ -Lokus integriert haben, konnten somit identifiziert werden.

8.3.3 Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette

Da die Neomycin-Kassette im Targeting-Konstrukt pIFN γ Trap von loxP-Sequenzen flankiert wird, ist es möglich, diese durch transiente Expression der Cre-Rekombinase, aus dem Genom zu deletieren (Abb. 41). Zur Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette, wurden die positiven ES Zell-Klone, wie bereits in Kap. 8.1.5 beschrieben, mit dem Vektor pGK-puroCre transient transfiziert und anschließend selektioniert. Die erfolgreiche Deletion der Neomycin-Kassette wurde dann durch PCR verifiziert. Hierzu wurde die Primer pNeo-O-S und pUK#95 verwendet. pNeo-O-S bindet innerhalb der TRAP-Kassette, während pUK#95 *downstream* der Neomycin-Kassette bindet (Abb. 41). Das Vorhandensein der Neomycin-Kassette ließ sich durch ein ~1,5 kb großes PCR-Produkt nachweisen (Abb. 47). Die Deletion der Neomycin-Kassette führte zu einem ~330 bp großen Fragment (Abb. 48). Bei der möglichen

Deletion der TRAP-Kassette und dem Verbleib der Neomycin-Kassette, bzw. der Deletion beider Komponenten wurden in der PCR keine Produkte erwartet.

Abb. 47 Etablierung der PCR zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette. Das Vorhandensein der Neomycin-Kassette ließ sich durch PCR, unter Verwendung der Primer pNeo-O-S und pUK#95, als 1,5 kb großes Fragment nachweisen. Hierzu wurden 100 ng genomische DNA des nicht-deletierten ES Zell-Klons 27 verwendet. Dieses PCR-Produkt ließ sich nicht mit genomischer DNA von IB10-ES-Zellen reproduzieren. M - Marker



Die Deletion der Neomycin-Kassette wurde zunächst mit den positiven ES Zell-Klonen 6_5 und 7_22 durchgeführt. In jeweils 24 G418-sensitiven Klonen, ließen sich 2 (Klon 6_5_3 und 6_5_16) bzw. 3 (Klon 7_22_27, 7_22_37 und 7_22_48) Klone identifizieren, in denen die Neomycin-Kassette deletiert wurde (Abb. 48).

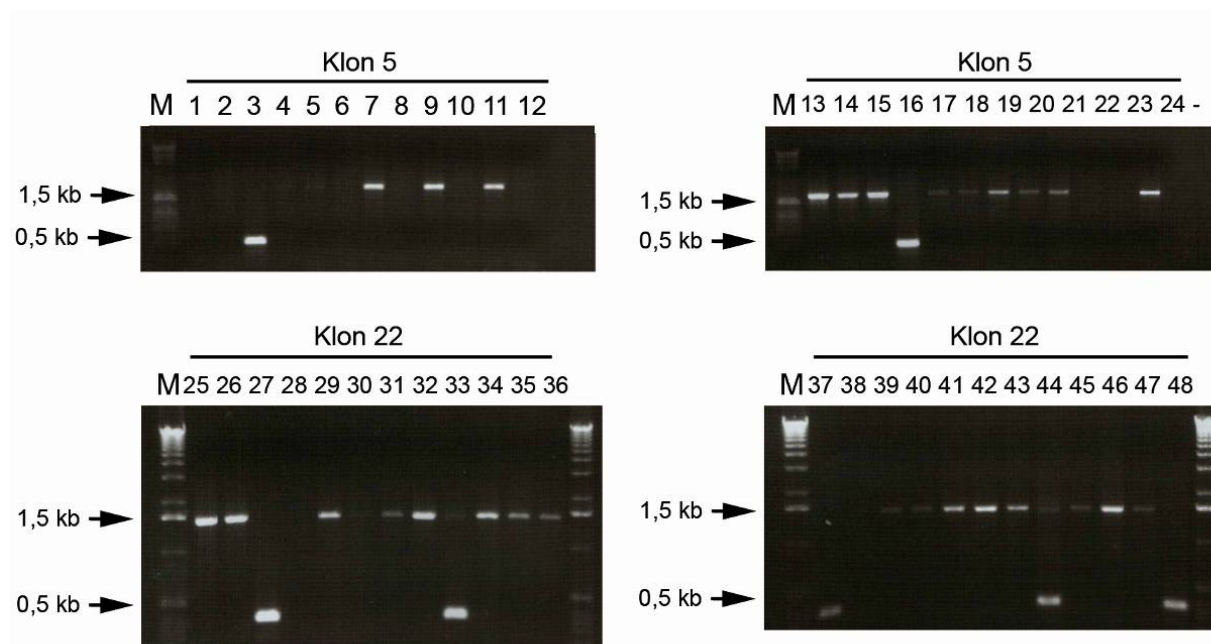


Abb. 48 Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette durch PCR. Der Nachweis der Deletion wurde unter Verwendung der Primer pNeo-O-S und pUK#95 durchgeführt. Nicht-deletierte Klone lassen sich durch ein 1,5 kb Fragment nachweisen. Deletierte Klone zeigen ein 330 bp-Produkt. Je PCR wurden 100 ng genomischer DNA verwendet. – Wasserkontrolle, M – Größenmarker

8.3.4 Generierung transgener Mäuse

ES Zell-Klone welche in eine Wirtsblastozyste injiziert und in pseudoschwangere Mäuse implantiert werden, haben theoretisch die Fähigkeit zu allen Geweben einer Maus beizutragen. Der sich daraus entwickelnde Embryo ist eine genetische Chimäre. Chimären enthalten zwei Populationen von Zellen, die aus verschiedenen Zygoten abstammen: diejenigen der Blastozyste und die der implantierten Stammzellen. Sie sind somit partiell transgene Tiere.

Zur Generierung von chimären Tieren wurde der ES Zell-Klon 7_22_37 am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig in Blastozysten mit C57Bl/6 genetischem Hintergrund mikroinjiziert (Tabelle 17). Die hier verwendeten Stammzelllinie IB10 (SV/129 Hintergrund) führt zur Ausprägung der Fellfarbe Agouti (braun). Da die Fellfarbe Agouti dominant gegenüber den rezessiven Fellfarben Schwarz (C57Bl/6) und weiß (Balb/c) ist, lässt sich der Grad des Chimärismus der generierten Mäuse anhand der Fellfarbe abschätzen. Insgesamt konnten hierbei 11 chimäre Tiere erzeugt werden. Da das Transgen an die nachfolgende Generation weitervererbt werden soll, bedarf es der Beteiligung der genetisch veränderten ES Zellen an der Keimbahn. Um die Keimbahntransmission des Transgens zu ermöglichen und somit vollständig transgene Tiere zu generieren, wurden chimäre Mäuse mit Balb/c-Mäusen weiterverpaart. Vollständig transgene Tiere liessen sich anschließend auf Grund der Fellfarbe Agouti identifizieren. Nicht-transgene Tiere weisen die, durch den genetischen Hintergrund der Blastozyste determinierte, Fellfarbe auf. Insgesamt konnten durch Verpaarungen 66 Nachkommen in der F1-Generation erzeugt werden. Dabei entstanden 64 Tiere mit weißer Fellfarbe und 2 Tiere mit der Fellfarbe Agouti, was auf die Beteiligung des ES Zell-Klons 7_22_37 an der Keimbahn schliessen lässt. Die erfolgreiche Keimbahntransmission und Vererbung des durch *gene targeting* mutierten IFN γ -Lokuses wurde durch PCR verifiziert (Abb. 49A). Um weitere erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens zu erzielen, dauern die Verpaarungen weiter an.

ES Zell Klon	Subklon	Mikroinjiziert	Genetischer background	Anzahl chimärer Tiere	Weibchen	Männchen	F1 (Agouti)	F1 (Balb/c)
7_22	7_22_37	HZI	C57Bl/6	11	5	6	2	62

Tabelle 17 Herstellung chimärer und vollständig transgener Mäuse. Der ES Zell-Klon 7_22_37 wurde durch Mikroinjektion in Blastozysten injiziert und pseudoschwangeren Weibchen implantiert. Die daraus resultierten Chimären wurden zur Generierung transgener Tiere weiterverpaart.

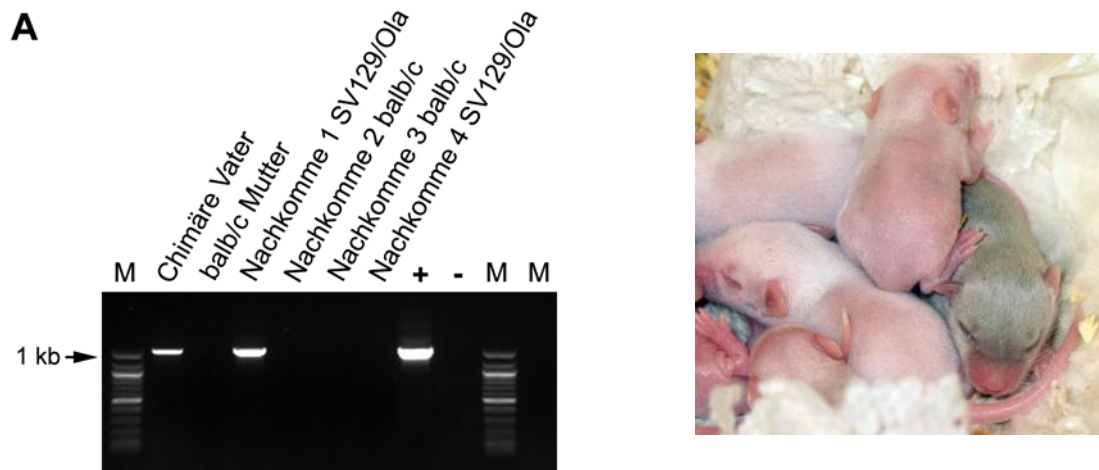


Abb. 49 (A) Nachweis der Keimbahntransmission durch PCR. Genomische DNA wurde in der *screening*-PCR eingesetzt (vgl. Abb. 45). Sowohl in der parentalen Chimäre, als auch bei Nachkommen lässt sich das Transgen im IFN γ -Lokus durch eine 1,2 kb große Bande im Agarosegel nachweisen. In nicht-transgenen Nachkommen und bei Vererbung des nicht-mutierten Allels ist kein Signal im Agarosegel nachweisbar. M – Marker, - Wasserkontrolle, + genomische DNA des Stammzellklons. **(B) Fotografie eines erzeugten transgenen Nachkommens.** Die Ausprägung der Fellfarbe Agouti lässt auf eine erfolgreiche Beteiligung der durch *gene targeting* mutierten ES Zell-Klone an der Keimbahn schliessen. Die Vererbung des Transgens wurde anschliessend durch PCR verifiziert.

9 Diskussion

9.1 Entwicklung eines neuen Maus-Modells zur Analyse der PrP-spezifischen Immuntoleranz

Prionenerkrankungen stellen fatale, neurodegenerative Krankheiten dar, für die zurzeit weder prophylaktische noch therapeutische Maßnahmen verfügbar sind. Verschiedene Wirkstoffe wie Quinacrin oder Anthrazykline, welche darauf abzielen, die Ausbreitung von PrP^{Sc} einzuschränken, sind durch ihre Toxizität oder ihre Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden therapeutisch limitiert (Head, M. W. und Ironside, J. W., 2000; Rudyk, H. *et al.*, 2000). Bis vor kurzem war die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen gegen neurodegenerative Krankheiten weitgehend vernachlässigt worden, obwohl vermehrt Erfolge gegen nicht-infektiöse Krankheiten wie Krebserkrankungen verzeichnet werden konnten. Dies mag mit den Gefahren von Immunreaktionen gegen das gewöhnlich immunprivilegierte ZNS und daraus resultierenden Autoimmunreaktionen gegen Selbst-Determinanten zusammenhängen. Seit Schenk *et al.* die Antikörper-vermittelte Beseitigung von amyloiden Plaques in einem transgenen Alzheimer Mausmodell beschrieben, sind verschiedene Studien der Frage nachgegangen, ob diese Strategie zur Behandlung oder Prophylaxe bei verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten zu verfolgen ist (Schenk, D. *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Peptiden von verschiedenen ZNS-spezifischen Proteinen Immunantworten induzierte, allerdings keine Autoimmun-Krankheiten auslöste (Mor, F. und Cohen, I. R., 2006).

Obwohl eigentlich keine Immunantworten gegen Selbst-Proteine wie das Prion-Protein zu erwarten sind, scheinen immuntherapeutische Strategien auch in diesem Fall vielversprechend zu sein. So konnte in passiven Immunisierungsstudien mit PrP^C-spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass die Prionen-Replikation *in vitro* und *in vivo* derart behindert werden konnte, dass daraus eine verlängerte Inkubationszeit der Krankheiten resultierte (Peretz, D. *et al.*, 2001; Sigurdsson, E. M. *et al.*, 2003; White, A. R. *et al.*, 2003). Allerdings besteht bei passiven Immunisierungen die Problematik darin, ein stabiles und schützendes Antikörperlevel zu erhalten. Die Induktion von aktiven PrP^C-spezifischen Immunantworten könnte diese Hürde überwinden. Da PrP^C ein endogenes, ubiquitär exprimiertes Protein ist, werden diese Immunantworten jedoch gewöhnlich durch Toleranzmechanismen des Immunsystems unterbunden. Jedoch konnte in einem transgenen Mausmodell, in dem sich *in*

in vivo PrP-spezifische B Zellen und IgM-Antikörper entwickelten, gezeigt werden, dass die Immuntoleranz auf B Zell-Ebene nicht absolut ist (Heppner, F. L. *et al.*, 2001b). Diese Vermutung wird durch neue Erkenntnisse gestützt, wo Immunisierungen mit PrP-Dimeren (tandem PrP – tPrP) und CpG-Adjuvanz zur Induktion PrP-spezifischer T und B Zell-Antworten in WT Mäusen führten (Kaiser-Schulz, G. *et al.*, 2007).

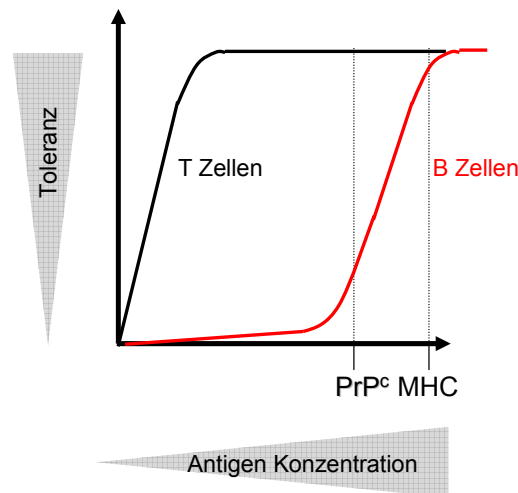


Abb. 50 Modell zur B und T Zell-Toleranz. T Zellen werden durch geringe Mengen Selbst-Antigen tolerant. B Zellen benötigen eine wesentlich höhere Ag-Konzentration zur Tolerierung (z. B. MHC-Expression). Die geringere Expression von PrP scheint nicht ausreichend zu sein, um B Zellen vollständig zu tolerieren und ermöglicht die Aktivierung PrP-spezifischer B Zellen (Kalinke, U. *et al.*, 2006).

Bisher sind die Mechanismen, die zu Toleranz oder Autoimmunität führen, nur ungenügend verstanden. Vor allem im Hinblick darauf, dass immuntherapeutische Ansätze gegen Selbst-Determinanten, wie das Prion-Protein im Falle von TSE-Erkrankungen aber auch amyloidähnliche Protein-Ablagerungen bei der Alzheimerschen und Parkinsonschen Krankheit, in Betracht gezogen werden, sollte in dieser Arbeit ein neues *in vivo* Modell zur Untersuchung der immunologischen B Zelltoleranz gegenüber Selbst-Determinanten, im Speziellen dem Prionen-Protein, generiert werden. Die Menge an exprimiertem Selbstantigen, die multivalente Präsentation des Selbstantigens und die Affinität des B Zell-Rezeptors spielen eine wichtige Rolle für die Induktion von B Zell Toleranz. So ist es denkbar, dass B Zellen mit schwachen Affinitäten gegenüber Selbstantigenen fähig sein könnten, schwach-affine anti-Selbst-Antikörper zu produzieren. Dies führt zu dem Modell, in dem die Gegenwart eines schwach exprimierten Selbst-Antigens zu einer vollständigen T Zell-Toleranz führt, wohingegen B Zellen höhere Antigenmengen zur Tolerisierung benötigen (Abb. 50). Die Gegenwart großer Mengen eines Selbst-Antigens (z.B. MHC-Moleküle)

induzieren sowohl in T Zellen, als auch in B Zellen Toleranz, wohingegen die Expression geringerer Mengen Selbst-Antigen (z.B. PrP^C) die Möglichkeit der Entwicklung von reaktiven B Zellen zulassen könnte. Grundsätzlich weisen die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass das Level an exprimiertem Selbst-Antigen, welches für die Induktion von B Zell-Toleranz benötigt wird, höher liegt, als für die Induktion der T Zell-Toleranz (Kalinke, U. *et al.*, 2006). Das neue Mausmodell soll es erlauben, konstante PrP-spezifische Immunglobuline in Gegenwart physiologischer Level an PrP zu induzieren und den Wechsel zwischen den Ig-Isotypen zuzulassen. Hierbei führt die Integration des Targeting-Konstruktes in das Genom der elektroporierten ES Zellen auf einem Allel zu der Ersetzung aller endogenen J_H-Elemente und des letzten D-Elements. Mäuse, die aus derart veränderten ES Zellen abstammen, besitzen bereits ein funktionales VDJ-Rearrangement, welches in den IgH-Lokus integriert wurde. Somit ist es B Zellen möglich, einen Prä-B Zell-Rezeptor zu exprimieren, während weitere Genumlagerungen dabei gestoppt werden. Dieser Prozess stellt, wie von Burnet postuliert, die allelische Exklusion sicher (Burnet, F. M., 1976). Somit entwickeln sich in transgenen Mäusen B Zellen, die zunächst ausschließlich die V_H-Region des anti-LCMV-spezifischen Antikörpers exprimieren und die Ig schwere Kette mit endogenen leichten Ketten paaren können. Durch die Verpaarung von V_HKL25/V_H6H4flox-Mäusen mit einer Cre-*deleter*-Mauslinie (Schwenk, F. *et al.*, 1995), kann eine konstitutive Expression der PrP-Spezifität in B Zellen erreicht werden. Hierbei kann das Schicksal potentiell autoreaktiver Zellen, die Entstehung von PrP-spezifischen Antikörpern und durch den möglichen Isotyp-Wechsel, potentielle Autoimmun-Phänomene untersucht werden (Tabelle 18). Des Weiteren können V_HKL25/V_H6H4flox-Mäuse mit einer induzierbar Cre-exprimierenden Mauslinie (Spiotto, M. T. *et al.*, 2003) verkreuzt werden. Nach Induktion der Cre-Expression kann die loxP-flankierte V_H-Kassette invertiert werden, was zur Expression der V_H-Region des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4 führt, während die Expression von V_HKL25 gestoppt wird. Dies führt zu einer Situation, in der das Schicksal potentiell autoreaktiver B Zellen, in Gegenwart von B Zellen ermittelt werden kann, die nicht-autoreaktive Spezifitäten exprimieren. Schließlich sollen die potentiell schützenden Funktionen aktiv induzierter PrP-spezifischer Antikörperantworten nach einer Prionen-Infektion analysiert werden, wobei die Prüfung verschiedenster Immunisierungsstrategien denkbar ist.

Tabelle 18 Experimentelle Einsatzmöglichkeiten des neuen V_HKL25/V_H6H4flox Mausmodells

Einsatzmöglichkeiten des neuen Mausmodells	Wie	Zu beantwortende Fragen
Konstitutive Expression der PrP-Spezifität in Gegenwart von PrP	Verpaarung mit Cre- <i>deleter</i> Mauslinie	Entwicklung PrP-spezifischer B Zellen? Aktivierung, Anergie, Apoptose? Spontane oder induzierbare Antikörper-Antworten?
Induzierbare Expression der PrP-Spezifität in Gegenwart von PrP und nicht-autoreaktiver B Zellen	Verpaarung mit induzierbar Cre-exprimierenden Mauslinien	Autoimmunität? Isotypwechsel möglich? Vermittelter Schutz nach Prionen-Infektion? Einfluss verschiedener Immunisierungsstrategien?

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte neue Mausmodell sollte mittels zielgerichteter Mutagenese (*Gene-Targeting*) von murinen embryonalen Stammzellen hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Targeting-Vektor kloniert, welcher eine Kassette enthält, die zwei zueinander invers orientierte, rearrangierte V_H-Regionen enthält. Die in transkribierbarer Orientierung vorliegende V_H-Region stammte dabei aus dem LCMV-spezifischen Antikörper KL25 (V_HKL25). Das V_HKL25 kodierende Genfragment wurde aus dem Vektor pPARAμ (Seiler, P. *et al.*, 1997) durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* herausgeschnitten. In 5'-Richtung dieser V_H-Region wurde in inverser Orientierung die V_H-Region des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4 (Korth, C. *et al.*, 1997) kloniert, welche zuvor durch Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *NaeI* aus dem Vektor p6H4Cμ (Heppner, F. L. *et al.*, 2001b) gewonnen wurde. Diese V_H-Kassette wird durch loxP-Sequenzen, die zueinander in entgegengesetzter Orientierung vorliegen, flankiert. Hierzu wurde eine synthetisch hergestellte loxP-Sequenz 3' der V_HKL25-Region kloniert. Als Targeting Vektor wurde piV_HL2neo^r verwendet, der bereits erfolgreich für mehrere *Targetings* im Immunglobulin schwere Ketten (IgH) Locus eingesetzt wurde (Taki, S. *et al.*, 1993; Hangartner, L. *et al.*, 2003). Zur Selektion von stabil transfizierten ES Zell-Klonen enthält der Vektor piV_HL2neo^r

eine Neomycin-Kassette und für eine negative Selektion von Transfektanten, die das Konstrukt zufällig im Genom integriert haben, die codierende Region der Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK). Es ist bekannt, dass durch Verwendung dieser Positiv/Negativ-Selektion nach Elektroporation von murinen embryonalen Stammzellen die Anzahl an nicht homolog rekombinierten Klonen um einen Faktor von 5-20 verringert werden kann (Thomas, K. R. und Capecchi M.R., 1987; Torres, R. M. und Kühn, R., 1997). Durch die Etablierung einer sensitiven und spezifischen PCR war es möglich transfizierte ES Zell-Klone in *pools* zu analysieren. Mit Hilfe dieser PCR konnten positive ES Zell-Klone von Klonen unterschieden werden, die das Targeting-Konstrukt entweder nicht oder nur zufällig, das heißt an einem beliebigen Ort im Genom, integriert hatten. Die Elektroporationen wurden mit murinen ES Zellen des E14 Subklons IB10 durchgeführt (Robanus-Maandag, E. *et al.*, 1998). Diese ES Zelllinie, die ursprünglich aus SV129/Ola Blastozysten isoliert wurde, ist bekannt für ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Keimbahntransmission. Da homologe Bereiche des Targeting-Vektors größtenteils isogen zu SV129/Ola sind, wird die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination und somit der erfolgreichen Generierung einer transgenen Maus erhöht (Torres, R. M. und Kühn, R., 1997).

Insgesamt konnten 4 unabhängige Stammzellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt durch homologe Rekombination in den IgH-Lokus integriert hatten. Zur Verifizierung wurden zusätzlich genomische Southern Blots durchgeführt, durch die sich der Ort der Integration des Targeting-Konstrukts eindeutig nachweisen ließ. Hierbei konnte die Integration des Targeting-Konstrukts in den genomischen IgH-Lokus bei einem der vier PCR-positiven ES Zell-Klone nicht bestätigt werden, womit gezeigt werden konnte, dass die *Screening*-PCR als alleiniges Mittel zur Identifikation von positiven ES Zell-Klonen nicht ausreichend ist.

Um einen Einfluss der Neomycin-Kassette auf die Genregulation im rekombinierten Locus auszuschließen (Fiering, S. *et al.*, 1995), konnte die von zwei loxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette durch transiente Transfektion der positiven ES Zell-Klone mit dem Cre-exprimierenden Vektor pGK-puroCre aus dem Genom deletiert werden (Gu, H. *et al.*, 1993). Der Nachweis der Neo-Deletion wurde in allen positiven ES Zell-Klonen durch mehrere, spezifische PCRs nachgewiesen. Die aus der Neo-Deletion resultierenden ES Zell-Klone wurden anschließend zur Mikroinjektion in murine Blastozysten verwendet. Die sich daraus entwickelnden genetischen Chimären bestehen aus Zellen der Blastozyste und denen der implantierten Stammzellen. Insgesamt konnten 23 Chimäre mit C57Bl/6-Hintergrund und einem Fell-Chimärismus von 5-25% erzeugt werden. Aus der Injektion in BALB/c-

Blastozysten resultierten 7 Chimären mit einem Fell-Chimärismus von 50-100%. Um die Keimbahntransmission des Transgens zu ermöglichen und somit vollständig transgene Tiere zu generieren, wurden chimäre Mäuse mit WT-Tieren des gleichen, der jeweiligen verwendeten Blastozyste entsprechenden, genetischen Hintergrunds weiterverpaart. Vollständig transgene Tiere hätten sich anschließend auf Grund der braunen Fellfarbe Agouti identifizieren lassen. Nicht-transgene Tiere weisen die durch den genetischen Hintergrund der Blastozyste determinierte Fellfarbe auf. Insgesamt konnten durch Verpaarungen 274 Nachkommen in der F1-Generation erzeugt werden. Dabei entstanden 33 Tiere mit weißer Fellfarbe und 241 Tiere mit schwarzer Fellfarbe. Eine erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens konnte somit noch nicht festgestellt werden; daher dauern die Verpaarungen weiter an.

9.2 Bedeutung der Struktur lymphatischer Organe für die Induktion anti-viraler Antikörperantworten

Während wesentliche Elemente des Immunsystems notwendig sind, um eine periphere Scrapie-Infektion in das zentrale Nervensystem zu transportieren, kann die Störung verschiedener Komponenten des Immunsystems eine mehr oder minder starken Resistenz gegenüber Prioneninfektionen bedingen. Die korrekte Struktur und Architektur der lymphatischen Organe spielt aber nicht nur für den Verlauf einer Prioneninfektion eine entscheidende Rolle. Das Immunsystem muss sicherstellen, dass in den Körper eingedrungene konventionelle Pathogene erkannt werden. Dies wird in den lymphatischen Organen u. a. durch hoch geordnete Strukturen, mit einer spezialisierten Mikroarchitektur und von Immunzellen innerhalb der lymphatischen Organen, gewährleistet. Der $LT\alpha\beta$ -LT β R (Lymphotoxin α/β -Lymphotoxin β -Rezeptor) Signalweg ist dabei unentbehrlich für Entwicklung, Differenzierung und Erhaltung sekundärer lymphatischer Organe. $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse besitzen keine Lymphknoten und weisen eine gestörte Milzarchitektur auf (Mebius, R. E., 2003; Spahn, T. W. *et al.*, 2005). Das Fehlen der $LT\alpha$ -Expression führt außerdem zum Verlust eines funktionalen Netzwerkes follikulärer dendritischer Zellen (FDCs) (Mackay, F. und Browning, J. L., 1998).

Um den Einfluss der Struktur lymphatischer Organe auf die Immunantwort und die Pathogenese bei Virusinfektionen zu untersuchen, wurden Experimente mit $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. Unter Verwendung der Mauslinie $LT\alpha^{-/-}$ Lck $LT\alpha\beta$, welche ein $LT\alpha/\beta$ -Transgen auf T Zellen exprimiert, sollte gezeigt werden, ob nach einer Virusinfektion der $LT\alpha^{-/-}$ Phänotyp aufgehoben werden kann.

Zunächst wurden Mäuse intranasal (*i.n.*) mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) infiziert. $LT\alpha^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ und C57Bl/6 LckLT $\alpha\beta$ Mäuse zeigten bei geringen VSV-Dosen *i.n.* keine signifikante Suszeptibilität für eine VSV-Infektion, verstarben aber nach Erhöhung der Dosis. Dies ist auf den bekannten Neurotropismus von VSV zurückzuführen. Das Virus gelangt dabei über die olfaktorischen Rezeptorneuronen der Nase in das ZNS und führt dort zu einer letalen Enzephalitis (Plakhov, I. V. *et al.*, 1995; Reiss, C. S. *et al.*, 1998a). Immunologische Organe und Strukturen scheinen bei diesem Prozess eine untergeordnete Rolle zu spielen, sodass kein Unterschied zwischen dem Phänotyp von WT und $LT\alpha^{-/-}$ Tieren erkennbar wird. Da nasale lymphoide Strukturen sich unabhängig von LT α entwickeln (Harmsen, A. *et al.*, 2002), wurde bereits früher vermutet, dass LT α -defiziente Mäuse relativ unempfindlich gegenüber Infektionen des Respirationtraktes sind (Schneider, K. *et al.*, 2004). In weiteren Experimenten wurde die Verabreichungsrouten verändert und die Versuchstiere mit VSV intravenös (*i.v.*) infiziert. Nach einer *i.v.* Infektion werden die Pathogene durch die Milz aus dem Blut gefiltert und Immunzellen präsentiert (Mebius, R. E. und Kraal, G., 2005). Eine mittlere Virusdosis konnte sowohl von WT-Tieren, als auch von $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäusen toleriert werden. Erst nach Erhöhung der Infektionsdosis konnten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Während WT-Tiere die Infektion kontrollierten, starben ca. 50% der $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Tiere 11-13 Tage nach der Infektion. Dieses differenzierte Verhalten von $LT\alpha^{-/-}$ Tieren nach Infektion mit hohen Virus Dosen bestätigt Ergebnisse, in denen $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse nach einer Hochdosis-Infektion mit Influenza eine erhöhte Suszeptibilität im Vergleich zu WT-Tieren zeigten, während sie in der Lage waren niedrige und mittlere Dosen zu tolerieren (Lund, F. E. *et al.*, 2002). Das $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse grundsätzlich, trotz ihrer gestörten lymphoiden Architektur, in der Lage sind Virusinfektionen zu kontrollieren und zu beseitigen, konnte vorher auch durch die Infektion mit murinem Gammaherpes Virus (MHV) gezeigt werden (Lee, B. J. *et al.*, 2000).

Das Fehlen der LT α -Expression führt zum Verlust eines funktionalen FDC-Netzwerkes (Mackay, F. und Browning, J. L., 1998), welches essentiell für die Positionierung von B Zellen in B Zell-Follikeln, die Antigenpräsentation und für effiziente Keimzentrum-Reaktionen ist (Gommerman, J. L. und Browning, J. L., 2003). Dies kann die Induktion von Antikörperantworten in $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse einschränken, was bei bakterielle Infektionen mit *Mycobacterium bovis* oder *Citrobacter rodentium* gezeigt werden konnte (Bopst, M. *et al.*, 2001; Spahn, T. W. *et al.*, 2004). Um den Einfluss des LT α -*knockouts* auf die Induktion von Antikörper-Antworten nach einer Virusinfektion zu untersuchen, wurden $LT\alpha^{-/-}$ Tiere mit subletalen Dosen VSV *i.n.* infiziert und der Serumtiter an VSV-neutralisierenden Antikörpern

bestimmt. Hierbei ließen sich nach wenigen Tagen mit dem WT vergleichbare IgM-Antikörpertiter nachweisen. Auch der Isotypwechsel zu IgG konnte festgestellt werden, sodass in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen weder funktional, noch kinetisch Unterschiede in den primären B Zell-Antworten nachweisbar waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch 210 Tage nach Infektion mit VSV ein stabiler IgG-Titer aufrechterhalten wurde, sodass auch der immunologische Langzeitschutz in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein scheint.

In der Literatur sind jedoch oftmals diverse Beeinträchtigung der B Zell Antworten in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen beschrieben worden. So lösen UV-bestrahltes Herpes simplex Virus und *Keyhole limpet Hämocyanin* (KLH) nur schwache Antikörperantworten aus (Banks, T. A. *et al.*, 1995). Nach Immunisierung mit Schafserthrozyten (*sheep red blood cells* - SRBC) weisen $LT\alpha^{-/-}$ -defiziente Mäuse Defekte im Isotypwechsel auf (Fu, Y. X. *et al.*, 1997) und auch nach Immunisierung mit dem Proteinantigen NP-OVA ist die Affinitätsreifung von Antikörpern limitiert (Matsumoto, M. *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Influenza infizierte $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse eine Ag-spezifische $CD8^{+}$ T Zell-Antwort generieren und in der Lage sind spezifische B Zell-Antworten mit anschließendem Isotypwechsel auszubilden (Lund, F. E. *et al.*, 2002). Auch nach Infektion mit Maus Hepatitis Virus (MHV) konnte in $LT\alpha^{-/-}$ Tieren eine dem WT vergleichbare humorale Immunantwort und der Ig-Isotypwechsel beobachtet werden (Lee, B. J. *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass die hochrepetitive VSV-Proteinhülle IgM kreuzvernetzen kann, was zu einer T Zell-unabhängigen IgM-Antwort führt. Dagegen ist der Wechsel von IgM zum IgG-Isotyp T Zell-abhängig (Leist, T. P. *et al.*, 1987). Die Tatsache, dass die Injektion einer subletalen Dosis VSV in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen zu WT-ähnlichen humoralen Immunantworten und einem Antikörper-vermittelten Langzeitschutz führt, lässt vermuten, dass weder die Ablation von $LT\alpha$, noch die gestörten lymphoiden Strukturen die Ausbildung von effektiven B Zell-Antworten und B/T Zell-Interaktionen nach einer VSV Infektion beeinträchtigen.

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, lassen sich kaum Unterschiede in der Immunkompetenz zwischen WT und $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen nach einer Infektion mit dem starken Antigen VSV erkennen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den oben zitierten Experimenten, bei denen $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse reduzierte Immunantworten gegen verschiedene Antigene zeigten. Daraus ergibt sich die Frage, in wieweit eine gestörte lymphatische Architektur die Antikörper-Antworten bei der Verwendung von schwächeren Antigenen beeinflusst? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mäuse mit replikationsdefizienten, Virus-ähnliche Partikel VLP-VSV (*virus like particle-VSV*) (Bach, P. *et al.*, 2007) immunisiert. VLP-VSV werden durch Transfektion einer Zelllinie mit zwei unterschiedlichen

Expressionsplasmiden hergestellt, welche die Strukturproteine *gag* und *pol* des Murinen-Leukämie-Virus (MLV) und das VSV-Glykoprotein (VSV-G) exprimieren. Das VSV-G Protein, welches das Hauptantigen von VSV darstellt, wird anschließend unspezifisch in MLV-Partikel inkorporiert, welche sich von der Zellmembran lösen (Nikles, D. *et al.*, 2005).

Zunächst wurde die Menge an VSV-neutralisierenden Antikörpern nach Immunisierung von $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen mit VLP-VSV bestimmt. Eine intranasale Applikation von VLP-VSV führte dabei zu keiner messbaren Antikörper-Antwort. Das in Mäusen vorkommende nasopharyngeal-assoziierte lymphatische Gewebe (NALT) ist ein mukosales sekundäres lymphatisches Gewebe, welches alle lymphoiden Zellen und Strukturen enthält, die für die Induktion und die Regulation einer Immunantwort gegen in die Nasenhöhle eindringende Pathogene notwendig sind (Kiyono, H. und Fukuyama, S., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine intranasale Infektion mit Reoviren zur Generierung von Keimzentren, zur Ausbildung von Ag-spezifischem IgA und zur Aktivierung von $CD8^{+}$ T Zellen in NALT führt (Zuercher, A. W. *et al.*, 2002). Auch die *i.n.* Applikation von Hühnergammaglobulin (GC) in Verbindung mit dem Hapten (4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Acetyl (NP) löst eine Ag-spezifische IgA/IgG-Antwort aus (Shimoda, M. *et al.*, 2001). Zusätzlich zu der Fähigkeit Immunantworten zu induzieren spielt NALT eine Rolle bei der Regulation der mukosalen Toleranz, wobei wenig über die molekularen und zellulären Mechanismen bekannt ist (Prakken, B. J. *et al.*, 1997). Da bereits gezeigt werden konnte, dass VLP-VSV nach *i.v.* Injektion starke Immunantworten auslösen (Bach, P. *et al.*, 2007), ist es denkbar, wenn auch unwahrscheinlich, dass die *i.n.* Applikation von VLP-VSV zur immunologischen Toleranz führt. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass *i.n.* appliziertes VLP-VSV im Nasen- und Lungenepithel einem raschen Zerfall unterliegen und somit keine Immunantworten induziert werden können.

Nach intravenöser Injektion von VLP-VSV in WT-Mäuse konnten Antikörper im Serum der behandelten Mäuse nachgewiesen werden, die denen nach einer VSV-Infektion ähnlich waren. Zunächst konnte T Zell-unabhängiges VSV-neutralisierendes IgM nachgewiesen werden, während nach 4 Tagen der IgG-Klassenwechsel induziert wurde. In $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Tieren löste die *i.v.* Gabe von VLP-VSV die Induktion von IgM-Antworten aus, die, im Vergleich zum WT, um ein bis zwei \log_2 -Stufen schwächer ausfiel und anschließend keinen Wechsel zum IgG-Isotyp zur Folge hatte. Eine zweite Injektion von VLP-VSV löste in WT-Tieren eine klassische, sekundäre Antikörper-Antwort aus, die hauptsächlich durch die Bildung von IgG gekennzeichnet war. In $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen führt die Reimmunisierung nur zu einer leicht abgeschwächten IgM-Antwort. Dieser Phänotyp konnte in $LT\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäusen

durch die Expression des LckLT $\alpha\beta$ -Transgens in T Zellen nicht aufgehoben werden. Die hier nach Immunisierung von WT-Mäusen erhaltenen Daten bestätigen das hohe immunogene Potential von VLP-VSV nach *i.v.* Injektion, wonach eine starke IgM-Antwort und eine T Hilfe-abhängigen Isotypwechsel zu IgG ausgelöst wird (Bach, P. *et al.*, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die *i.v.* Immunisierung mit VLP-VSV in WT-Mäusen zur Generierung eines VSV-spezifischen immunologischen Gedächtnisses führt, da nach der erneuten Injektion von VLP-VSV, eine klassische sekundäre Immunantwort ausgelöst wurde, die durch eine schnelle Induktion großer Mengen IgG gekennzeichnet ist (Ahmed, R. und Gray, D., 1996). Die Expression des LT $\alpha\beta$ -Transgens auf T Zellen war jedoch nicht ausreichend, um in LT $\alpha^{-/-}$ LckLT $\alpha\beta$ Mäusen den Isotypwechsel zum IgG zu induzieren und ein VSV-spezifisches immunologisches Gedächtnis auszubilden. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Fu *et al.*, die WT-Splenozyten in LT $\alpha^{-/-}$ Mäuse transferierten und anschließend mit SRBC immunisierten. Dies war nicht ausreichend, um eine Ag-spezifische IgG-Antwort auszulösen. Im Gegensatz dazu war eine starke IgG Antwort gegen SRBC messbar, wenn WT-Mäuse mit LT $\alpha^{-/-}$ Splenozyten rekonstituiert wurden (Fu, Y. X. *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass LT-exprimierende Lymphozyten nicht ausreichend für den IgG-Klassenwechsel sind. Vielmehr scheinen die Mikroarchitektur der lymphatischen Organe und anderer LT-abhängigen Elemente notwendig zu sein um eine IgG-Antwort gegen VLP-VSV zu induzieren.

Zusammengefasst weisen die Resultate darauf hin, dass weder der LT-Signalweg, noch die exakte Architektur lymphoider Gewebe für die Induktion von effektiven Immunantworten gegen ein starkes Antigen wie replizierendes VSV absolut notwendig sind. VSV ist ein zytopathisches Virus, welches über *pattern recognition receptors* (PRR) wie Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) und NOD/NALP-Rezeptoren erkannt werden kann (Martinon, F. und Tschopp, J., 2005). VSV-Hüllproteine und ssRNA können über TLR7 (Lund, J. M. *et al.*, 2004) und TLR4 (Jiang, Z. *et al.*, 2005), die Erkennung der Virus Replikation über die Helikase RIG-I (Kato, H. *et al.*, 2005; Kawai, T. und Akira, S., 2007) erkannt werden und aktivieren somit zunächst das angeborene Immunsystem. Die anschließende Expression von großen Mengen Type I Interferon (IFN) und die Produktion von VSV-neutralisierenden Antikörpern sind hauptsächlich für die effiziente Eliminierung der Infektion verantwortlich. Des Weiteren wird die Expression von Interleukin 1b (IL-1b) erhöht, was auf die Aktivierung eines Toll-unabhängigen Signalweges der angeborenen Immunität hinweist (Lang, K. S. *et al.*, 2007). Diese parallele Aktivierung verschiedener Signalwege könnte, trotz gestörter lymphatischer Strukturen, die Induktion von effizienten Immunantworten gegenüber VSV-

Infektionen sicherstellen. VLP-VSV dagegen stellt ein nichtreplizierendes Antigen dar, welches auf Grund des Fehlens „fremder“ Nukleinsäuren vermutlich weder die Signalkaskaden von TLR noch von RIG-I aktivieren kann. Applizierte VLP-VSV lösen in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen keine IgG-Antwort aus. Da nach VSV-Infektion gezeigt werden konnte, dass der Ig-Klassenwechsel zu IgG von Typ I Interferonen abhängt (Bach, P. *et al.*, 2007), ist zu vermuten, dass in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen die Produktion von Typ I Interferonen nach Immunisierung mit VLP-VSV nicht induziert wird. Die Immunisierung mit dem im Vergleich zu VSV schwächeren, nichtreplizierenden Antigen VLP-VSV führt wahrscheinlich nicht zur Induktion der durch VSV aktivierten Signalpfade. In $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen werden die Interaktionen von Immunzellen, wie z.B. zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T Zellen, sowie T und B Zellen vermutlich derart behindert, dass hier die gestörte Struktur der lymphatischen Organe nur eine eingeschränkte Immunantwort gegen schwache Antigene zulässt.

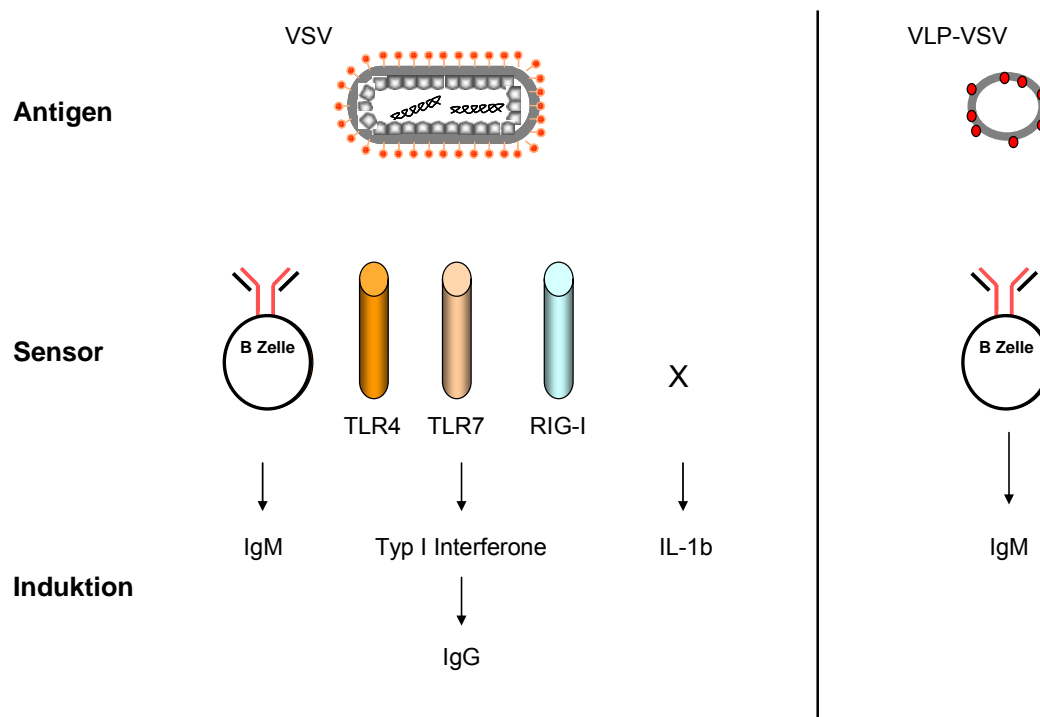


Abb. 51 Die Applikation schwacher Ag verdeutlicht die Bedeutung lymphatischer Mikroarchitektur. VSV und VLP-VSV induzieren über die Quervernetzung von B Zell-Rezeptoren (BCR) VSV-spezifische IgM-Antworten. Darüber hinaus kann VSV von verschiedenen PRR erkannt werden, was zur Aktivierung der entsprechenden Signalpfade führt und trotz gestörter lymphoider Architektur eine effiziente Immunantwort in $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen auslöst.

9.3 Die Funktion von TRADD, einem neuen Faktor der TNF-Familie, bei der Virusabwehr

Lymphotoxin α (LT α) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) sind zwei Vertreter der TNF/TNFR-Superfamilie, welche essentielle Funktionen in der Regulierung und der Aktivierung des Immunsystems bei bakteriellen und viralen Infektionen ausüben. TNF α ist einer der wichtigsten proinflammatorischen Faktoren des Immunsystems und zeigt ein enormes Spektrum an biologischen Aktivitäten, wobei die meisten Zelltypen in der Lage sind auf TNF α -Stimulation zu reagieren. Nach Kontakt mit dem Liganden formen TNF-Rezeptoren Trimere, was zur Dissoziation des inhibitorischen Proteins SODD (*silencer of death domain*) von der intrazellulären Todesdomäne führt. Die anschließende Bindung des Adaptorproteins TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) an die Todesdomäne ist der Initiator weiterer Proteinbindungen, welche diverse Signalfade aktivieren können. TRADD gehört zur Familie der Todesdomänen-Proteine, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion extrinsischer und intrinsischer Signale in eukaryotischen Zellen spielen und ist als wichtiges intrazelluläres Adaptorprotein bekannt, welches die Signale des Tumornekrosefaktor-Rezeptor I (TNFRI) vermittelt (Hsu, H. *et al.*, 1996b).

Um die Rolle von TNF α und TRADD für die Immunantwort nach einer Virusinfektion zu untersuchen, wurden TNF $\alpha^{-/-}$ und TRADD $^{-/-}$ Mäuse mit VSV infiziert und zunächst untersucht, ob diese, im Vergleich zu WT-Mäusen, eine veränderte Überlebensrate nach einer Virusinfektion aufweisen. Obwohl TRADD $^{-/-}$ und TNF $\alpha^{-/-}$ Mäuse bei mittleren Dosen VSV keine signifikant erhöhte Mortalität aufzeigten, erwiesen sie sich, im Vergleich zum WT, sensibler gegenüber hohen Dosen an VSV. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit Daten von Publicover *et al.*, wonach TNF $\alpha^{-/-}$ Mäuse eine Infektion mit 10^6 pfu VSV *i.n.* oder *i.m.* tolerieren und als Zeichen der Infektion nur ein geringer Verlust des Körpergewichts beobachtet werden konnte (Publicover, J. *et al.*, 2006).

Im neuen TRADD $^{-/-}$ Mausmodell (Ermolaeva, M. A. *et al.*, 2008) konnte ebenfalls nur bei hohen VSV-Dosen eine leicht erhöhte Sensitivität festgestellt werden, obwohl *in vitro* gezeigt werden konnte, dass der siRNA vermittelte TRADD-Reduktion zu einer verminderten RIG-I vermittelten antiviralen Antwort und einer erhöhten VSV-Replikation führte (Michallet, M. C. *et al.*, 2008).

Nach intravenöser (*i.v.*) Infektion von TNF $\alpha^{-/-}$ und TRADD $^{-/-}$ Mäusen mit VSV, ließen sich nach wenigen Tagen, unabhängig von der Infektionsdosis, rasch ansteigende neutralisierende

IgM-Antikörpertiter und der anschließende Isotypwechsel zu IgG nachweisen, sodass weder funktional noch kinetisch, Unterschiede in den primären Antikörper-Antworten von $\text{TNF}\alpha^{-/-}$, $\text{TRADD}^{-/-}$ oder WT-Tieren beobachtet werden konnten. Dies bestätigt Resultate in denen $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ Mäuse nach intranasaler (*i.n.*) Infektion mit 10^6 pfu VSV mit dem WT vergleichbare Mengen an VSV-neutralisierenden Antikörpern produzieren (Publicover, J. *et al.*, 2006).

Die Infektion mit VSV ist durch eine schnelle Induktion von Typ I Interferonen, wie z. B. Interferon α und β gekennzeichnet (Kawai, T. und Akira, S., 2006), die für das Überleben von infizierten Mäusen essentielle Faktoren darstellen (Muller, U. *et al.*, 1994). Um den Einfluss der $\text{TNF}\alpha$ - und TRADD -Deletion auf die Induktion von Type I Interferon zu untersuchen, wurde die Menge an gebildetem $\text{IFN}\beta$ nach einer VSV-Infektion bestimmt. In WT-Tiere ließen sich 24 h nach Infektion hohe Mengen $\text{IFN}\beta$ im Serum nachweisen. Im Gegensatz dazu war in $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TRADD}^{-/-}$ Tieren die $\text{IFN}\beta$ -Produktion nahezu vollständig unterbunden. Dies ist überraschend, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass 24 h nach *i.n.* Infektion mit VSV, hohe Mengen $\text{IFN}\alpha$ in $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ Mäusen messbar sind (Publicover, J. *et al.*, 2006). Jedoch ist bekannt, dass die Deletion von FADD, einem weiteren Mitglied der Familie der Todesdomänen-Proteine, zu einem Defekt der intrazellulären Erkennung von dsRNA und zu einer Verminderung der Produktion von Typ I Interferonen *in vitro* führt (Balachandran, S. *et al.*, 2004; Takahashi, K. *et al.*, 2006). Auf Grund der Tatsache das sowohl die Produktion von $\text{IFN}\alpha$, als auch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern nicht beeinträchtigt zu sein scheint, ist es $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ und $\text{TRADD}^{-/-}$ Tieren möglich, eine VSV-Infektion unter Kontrolle zu bringen.

Darüber hinaus ist bekannt das andere Mitglieder der Todesdomänen-Proteine wie FADD (*Fas-associated death domain*) und RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) neben ihrer Rolle bei der Induktion von Apoptose (Takahashi, K. *et al.*, 2006) auch Funktionen bei den RIG-I vermittelten antiviralen Aktivitäten übernehmen (Kawai, T. *et al.*, 2005). Da TRADD ebenfalls ein Mitglieder der Todesdomänen-Proteine darstellt und als wichtiges intrazelluläres Adaptorprotein bekannt ist, welches die Signale des Tumornekrosefaktor-Rezeptor I (TNFRI) vermittelt (Hsu, H. *et al.*, 1996b) stellt sich die Frage ob TRADD ebenso eine Komponente des RIG-I antiviralen Signalweges darstellt. Hierzu konnte in neuen Studien gezeigt werden, dass TRADD mit FADD und RIP-I Komplexe ausbilden kann, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ führten, welcher die Expression von Typ I IFN auslösen kann. Die VSV-Replikation, welche zellulär über die RNA-Helikase RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene I*) erkannt wird (Kawai, T. und Akira, S., 2007), konnte durch Überexpression von TRADD *in vitro* unterbunden werden konnte. Des Weiteren führte die siRNA vermittelte

TRADD-Reduktion *in vitro* zu einem 2-4 fachen Anstieg des Virustiters (Michallet, M. C. *et al.*, 2008). Die hier erhaltenen Daten zeigen, dass die Deletion von TRADD zu einer stark verminderten Produktion von IFN β führten. Somit scheinen die durch RIG-I vermittelte Erkennung von VSV und die anschließende Produktion von IFN β durch die Eliminierung von TRADD stark beeinträchtigt zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten konnten somit dazu beitragen TRADD als wichtige Komponente für die Induktion von Typ I IFN im RIG-I vermittelten antiviralen Signalpfad zu identifizieren (Michallet, M. C. *et al.*, 2008) (Abb. 52).

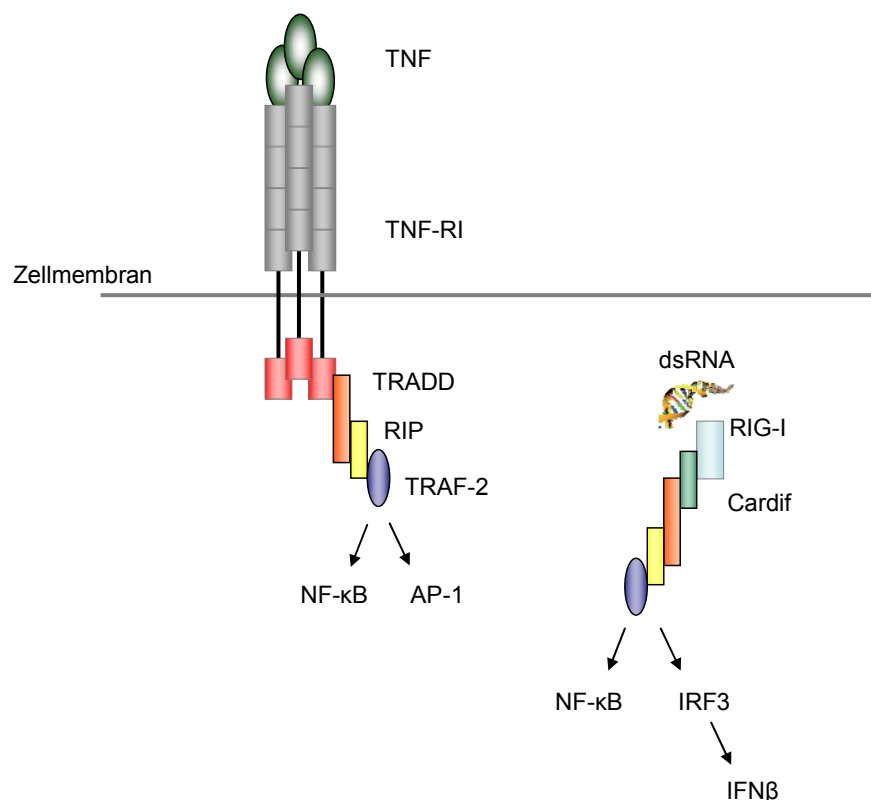


Abb. 52 TRADD als neue Komponente des RIG-I vermittelten antiviralen Signalpfades. Schematische Übersicht der TNFRI und RIG-I vermittelten Signalpfade. Virale RNA bindet an RIG-I und aktiviert über TRADD IRF3 zur Expression von IFN β .

9.4 Der Einfluss der Typ I Interferon-Rezeptor Stimulation auf myeloiden Zellen bei der Eliminierung von Virusinfektionen

Die Induktion von Typ I Interferonen stellt eine frühe und essentielle Antwort der angeborenen Immunität nach vielen verschiedenen Virusinfektionen dar. Mäuse ohne funktionales Typ I IFN-System besitzen nach z.B. VSV-Infektionen nahezu keinen immunologischen Schutz und versterben innerhalb weniger Tage (Muller, U. *et al.*, 1994; van den Broek, M. F. *et al.*, 1995). Nach einer Virusinfektion sind unterschiedliche Zellen in der Lage *in vitro* Typ I IFN zu produzieren, wobei die Hauptproduzenten nach einer *in vivo* Infektion oft plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) darstellen (Barchet, W. *et al.*, 2002). Die Bedeutung anderer Zelltypen in der Produktion von Typ I IFN *in vivo* ist bisher nur wenig untersucht (Pichlmair, A. und Reis e Sousa, 2007).

Während pDC bei Virämien in der Lage sind, IFN α in hohen Mengen zu synthetisieren, benötigen andere Zellen zur IFN α -Produktion einen parakrinen bzw. autokrinen Rückkopplungsmechanismus. Dabei bindet früh induziertes IFN an den Interferonrezeptor (IFNAR) und führt zu einer effizienten Verstärkung der IFN-Produktion (Waibler, Z. *et al.*, 2007). Interferonrezeptor-defiziente Mäuse (IFNAR^{-/-}) sind hoch anfällig gegenüber Infektionen mit verschiedenen Viren und zeigen darüber hinaus eine stark eingeschränkte Aktivität von natürlichen Killerzellen (Muller, U. *et al.*, 1994).

Um den Einfluss der Typ I IFN-Rezeptorstimulation auf der Ebene myeloider Zellen bei einer Virusinfektion zu untersuchen, wurde ein neues Mausmodell (LysMcre-IFNAR^{flox/flox}) verwendet, in dem der IFNAR auf myeloiden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten deletiert ist (König, M. *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Makrophagen werden nach ihrer Lokalisation in den Geweben als „Mikrogliazellen“ im zentralen Nervensystem, als „Kupffer-Zellen“ in der Leber und als „Alveolarmakrophagen“ in der Lunge bezeichnet. Im Rahmen der angeborenen Immunität kommt den Makrophagen als professionellen Phagozyten eine wesentliche Rolle zu. Die Erkennung von Pathogenen geschieht mittels Oberflächenrezeptoren, die die Zellen befähigen, mikrobielle Komponenten, wie z. B. Kohlenhydrate, Glykolipide, Proteolipide und Proteine zu erkennen (Greenberg, S. und Grinstein, S., 2002; Underhill, D. M. und Ozinsky, A., 2002). Zu diesen Rezeptoren zählen der Mannose-Rezeptor, *scavenger*-Rezeptoren, CD14 oder verschiedene TLRs (Akira, S., 2003). Makrophagen sind nach Infektion mit RNA-Viren in der Lage, über RIG-I-ähnliche Helikasen die Produktion von Typ I Interferon zu induzieren (Kumagai, Y. *et al.*, 2007).

Zur Deletion des IFNAR auf myeloiden Zellen wurden IFNAR^{flox/flox} Mäuse (Kamphuis, E. *et al.*, 2006), in denen das Exon 10 der IFNAR- α -Kette von loxP-Sequenzen flankiert wird, mit einer Mauslinie, die das Enzym Cre-Rekombinase unter dem murinen Lysozym M-Promoter (LysMcre) exprimiert verpaart und somit LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse generiert. Für LysMcre-Mäuse wurde eine Deletionseffizienz von 83-98% in reifen Makrophagen, nahezu 100% in Granulozyten und 16% in CD11c⁺ dendritischen Zellen beschrieben (Clausen, B. E. *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die IFNAR-Deletionseffizienz in verschiedenen Makrophagen-Subtypen von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen untersucht. Die IFNAR-Expression wurde jeweils auf F4/80⁺, MOMA1⁺ und MOMA2⁺ Zellen ermittelt, welche als Differenzierungsmarker für reife Makrophagen dienen (Tang, C. *et al.*, 2001; Lagranderie, M. *et al.*, 2003). Eine Deletionseffizienz von nahezu 100% konnte bei F4/80⁺ Zellen ermittelt werden, während MOMA1⁺ Makrophagen den IFN-Rezeptor zu 98% und MOMA2⁺ Zellen zu 94%, deletierten. Dies ist übereinstimmend mit publizierten LysMcre-spezifischen Deletionseffizienzen, die bei 75-99 % liegen (Takeda, K. *et al.*, 1999). Eine IFNAR-Deletion auf B und T Zellen war, wie zuvor beschrieben (Clausen, B. E. *et al.*, 1999), ebenfalls nicht feststellbar. Diese ersten Ergebnisse weisen auf die funktionale Deletion des Interferonrezeptors auf Zellen der myeloiden Linie im neuen LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mausmodells hin. Jedoch sollte in weiteren Experimenten die IFNAR-Deletion auf weiteren relevanten Zelltypen wie dendritischen Zellen, Granulozyten, Mikroglia und weiteren Makrophagen-Subpopulationen untersucht werden.

Die *i.v.* Infektion von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen mit einer Dosis von 2×10^6 pfu VSV ließ eine höhere Sensitivität gegenüber VSV im Vergleich zum WT deutlich werden. LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse waren ab einer Dosis von 2×10^7 pfu nicht mehr in der Lage, die Virusinfektion unter Kontrolle zu bringen, während WT-Mäuse die Infektion mit bis zu 2×10^8 pfu tolerierten. Diese intravenöse Gabe dirigierte das Antigen vornehmlich in die Milz (Mebius, R. E. und Kraal, G., 2005). Um den Einfluss von Typ I Interferonen nach einer peripheren Infektion zu untersuchen, die das Antigen zunächst zum drainierenden Lymphknoten oder in die mukosalen lymphoiden Gewebe führt, wurden Versuchstiere *i.n.* infiziert. Hierbei verstarben LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäuse bereits nach Injektion geringer Mengen VSV.

Während die *i.v.* Infektion mit geringen Mengen VSV trotz eines nicht-funktionales Interferonsystems in myeloiden Zellen toleriert wird, scheinen unabhängig der gewählten Route, bei mittleren und hohen Dosen injiziertem VSV, die Einflüsse von Typ I Interferon auf

myeloide Zellen, im Besonderen auf Makrophagen, einen entscheidenden Beitrag zur Eliminierung der Infektion zu leisten. Dies wird durch neue Erkenntnisse gestützt, die zeigen, dass Alveolarmakrophagen und nicht pDC die hauptsächlichen Typ I Interferon Produzenten nach einer *i.n.* Infektion mit dem RNA-kodierten *Newcastle disease Virus* (NDV) darstellen und die Viruseliminierung nach Depletion von Alveolarmakrophagen beeinträchtigt ist (Kumagai, Y. *et al.*, 2007).

Um den Einfluss der IFNAR-Deletion auf myeloide Zellen für die Induktion von Antikörper-Antworten zu untersuchen, wurden WT, IFNAR^{flx/flx} und LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Tiere mit einer subletalen Dosis VSV *i.v.* infiziert. Hierbei ließen sich in allen untersuchten Genotypen neutralisierende IgM-Titer und der Isotypwechsel zu IgG nachweisen. Das nicht-funktionale Interferonsystem in den myeloiden Zellen von LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäusen scheint somit keinen Einfluss auf die primären Antikörper-Antworten gegen VSV zu haben.

Bisher wurde postuliert, dass eine VSV-Infektion hauptsächlich durch die Induktion von Typ I IFN (Muller, U. *et al.*, 1994) und neutralisierenden Antikörpern kontrolliert wird. B Zell-defiziente Mäuse versterben wenige Tagen nach einer VSV Infektion (Thomsen, A. R. *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass in LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäusen, WT-ähnliche Antikörperantworten nach einer VSV Infektion hervorgerufen werden, die Tiere jedoch einen VSV-sensitiven Phänotyp aufweisen und frühzeitig versterben, zeigt die entscheidende Bedeutung eines funktionalen Interferonsystems auf myeloiden Zellen bei der Abwehr von VSV-Infektionen. Die korrekte IFN-Antwort in Zellen der myeloiden Linie, in einem ansonsten IFN-kompetenten Organismus, scheint eine bedeutende Rolle in der Virusabwehr zu spielen und bestätigt die bisherigen Erkenntnisse der antiviralen Aktivität von Typ I Interferonen auf Monozyten, Makrophagen und DC (Rehberg, E. *et al.*, 1982; Herberman, R. B. *et al.*, 1982).

LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäuse sind trotz normaler Antikörper-Antworten sensibler für eine VSV-Infektion. Zur Analyse des Virustropismus und der Virustiter in verschiedenen Organen, wurden Mäuse mit einer letalen Dosis VSV infiziert. Kurz nach Infektion konnte in keinem untersuchten Organ von WT- und IFNAR^{flx/flx}-Tiere VSV nachgewiesen werden, was auf eine schnelle Eliminierung des Pathogens schließen lässt. Es ist bekannt, dass in WT-Mäusen *i.n.* appliziertes VSV in Lunge und Leber repliziert und eine transiente Virämie hervorruft, bis es kurze Zeit später eliminiert werden kann (Roberts, A. *et al.*, 1999; Ramsburg, E. *et al.*, 2005). In LysMcre-IFNAR^{flx/flx} Mäusen ließen sich jedoch noch mehrere Tage nach Infektion, sowohl stark erhöhte VSV-Titer in der Milz, Lunge und Leber, als auch die Infektion des Gehirns nachweisen, welcher in den Kontrollgruppen nicht auftrat. In WT-

Tieren wird das neurotrope VSV wahrscheinlich rechtzeitig eliminiert, bevor es zu einer Infektion des ZNS kommen kann, während die IFNAR-Deletion auf myeloiden Zellen offensichtlich die Eliminierung von VSV so stark verzögert, dass eine Infektion des ZNS möglich wird.

Des Weiteren ist es denkbar, dass IFN-abhängige Vorgänge im ZNS von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen eine Rolle spielen. Im ZNS befinden sich z.B. Mikroglia-Zellen, welche ebenfalls zur myeloiden Linie gehören und dort die Funktion von Makrophagen übernehmen (Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., and Gratzl, M.2002; Welsch, U. and Sobotta, J.2003; Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., and Gratzl, M.2002). Ähnlich den konventionellen APCs exprimieren sie Toll-ähnliche-Rezeptoren und MHCI/II, die maßgeblich an der Erkennung von Pathogenen bzw. der Antigenpräsentation beteiligt sind (Guillemin, G. J. und Brew, B. J., 2004). Mikroglia sind in der Lage, Typ I IFN zu produzieren (Delhay, S. *et al.*, 2006; Sandberg, K. *et al.*, 1994), während virusinfizierte Neuronen Mikroglia über diverse Zytokine wie z.B. IFN α/β , IFN γ und IL-6 aktivieren können (Chapman, G. A. *et al.*, 2000).

Da gezeigt werden konnte, dass der im Gehirn endogen produzierte Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) in LysMcre-BDNF^{flox/flox}-Mäusen in Mikroglia deletiert wird (Linker, R. *et al.*, 2007), scheint es wahrscheinlich, dass es ebenfalls zur Deletion des IFNAR in Mikroglia von LysMcre-IFNAR^{flox/flox} Mäusen kommt. Welche Rolle Typ I IFN bei Virusinfektionen des ZNS spielen, ist bisher jedoch nicht hinreichend geklärt. Weitere Daten unserer Arbeitsgruppe bekräftigen jedoch einen Einfluss von Typ I IFN im ZNS bei Virusinfektionen. Hierbei wurde ein Mausmodell verwendet, indem eine Gewebe-spezifische Deletion des Typ I Interferonrezeptors im ZNS herbeigeführt wurde. In solchen NesCre^{+/-} IFNAR^{flox/flox} Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promoters exprimiert (Tronche, F. *et al.*, 1999) und führt somit zu einer ZNS-spezifischen Deletion des IFNAR. NesCre^{+/-} IFNAR^{flox/flox} Mäuse zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer peripheren VSV-Infektion und weisen im ZNS ebenfalls signifikante Virustiter auf, was auch hier den Schluss nahelegt, dass die Anwesenheit des IFN-Rezeptors im ZNS eine überlebenswichtige Rolle spielt und die periphere Immunität nicht ausreicht um Virusinfektionen des ZNS zu verhindern (Detje, C. *et al.*, unveröffentlicht).

Gewebespezifische Makrophagen erscheinen notwendig um über die PRR vermittelte Typ I IFN Produktion eine lokale VSV-Infektion zu kontrollieren. Die Deletion des IFNAR auf Makrophagen führt zu einer stark verminderten Virus-Eliminierung und zu einem veränderten Virustropismus. Auch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern kann die längere

Persistenz des Virus nicht verhindern, welche vermutlich die anschließende letale Infektion des ZNS begünstigt. Die Daten dieser Arbeit weisen auf einen entscheidenden Beitrag von Makrophagen-produzierten Typ I Interferonen bei der Eliminierung von peripheren VSV-Infektionen hin und demonstrieren die Bedeutung von lokalen antiviralen Zellen bei dem natürlichen Verlauf einer Virusinfektion.

9.5 Herstellung eines neuen Mausmodells zur konditionellen Rekonstitution von IFN γ

IFN γ ist ein pleiotropes Zytokin, welches an einer Vielzahl von immunmodulatorischen Prozessen beteiligt ist und hauptsächlich von T Zellen, NK Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird. In Infektionsstudien konnte belegt werden, dass IFN $\gamma^{-/-}$ und Interferon γ Rezeptor-defiziente (IFNGR1 $^{-/-}$) Mäuse Defizite in der natürlichen Resistenz gegen bakterielle, parasitäre und virale Infektionen zeigen (Huang, S. *et al.*, 1993; van den Broek, M. F. *et al.*, 1995; Buchmeier, N. A. *et al.*, 1995).

Die zentrale Rolle von IFN γ bei der Kontrolle von intrazellulären Pathogenen und der Entwicklung von effektiven adaptiven Immunantworten ist seit langem unzweifelhaft nachgewiesen (Schroder, K. *et al.*, 2004). Jedoch ist der zelluläre Ursprung von IFN γ während den verschiedenen Phasen einer Infektion nur gering definiert. Besonders während der frühen Phase einer Immunantwort, wenn große Mengen Antigen (Ag)-spezifische T Zellen noch nicht am Ort der Infektion angelangt sind, gestaltet sich die Identifikation der Quelle der IFN γ Produktion schwierig und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Maus-Infektionen mit *L. monocytogenes* oder *Leishmania* lieferten Hinweise auf die IFN γ -Expression durch NK Zellen oder T Zellen, jedoch nicht durch myeloide Zellen wie Makrophagen (Scharton, T. M. und Scott, P., 1993; Andersson, A. *et al.*, 1998). Jedoch stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu Studien welche die IFN γ -Expression in myeloiden Zellen nach Infektionen mit *Listeriosis*, *Toxoplasmosis* (Suzue, K. *et al.*, 2003), *Chlamydia pneumonia* (Rothfuchs, A. G. *et al.*, 2004) nachweisen konnten.

Obwohl virale Infektionen zunächst die schnelle Induktion von Typ I IFN nach sich ziehen, sind die immunmodulatorischen Effekte von IFN γ bedeutsam für die spätere Koordinierung der Immunantwort und der Etablierung eines antiviralen Status, der für die Langzeitkontrolle einer Virusinfektion benötigt wird (Huang, S. *et al.*, 1993; Lu, B. *et al.*, 1998; Cantin, E. *et al.*, 1999a). Unter Verwendung der generierten Mauslinien kann somit die Rolle von

konditionell exprimiertem IFN γ in der Pathogenese verschiedenster Virus-Infektionen analysiert werden.

Des Weiteren bietet das neue Mausmodell zahlreiche neue Möglichkeiten zur Analyse von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose (MS). Diese kann im Tiermodell durch Auslösung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) nachgestellt werden. Während der EAE kommt es zur lokalen Infiltration von autoreaktiven T Zellen im ZNS, die eine gegen die Myelinscheidenproteine gerichtete Entzündung initiieren (Muraro, P. A. *et al.*, 2002). Man geht davon aus, dass aktivierte Th₁ Zellen nach dem Überwinden der Blut-Hirn-Schranke eine Entzündung durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN γ und TNF α initiieren (Wekerle, H. *et al.*, 1986; Hickey, W. F. *et al.*, 1991). In der Entzündungsreaktion spielen neben T Zellen und Makrophagen auch dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und B Zellen eine Rolle (Serafini, B. *et al.*, 2000; Chavarria, A. und cocer-Varela, J., 2004). Unter Verwendung der neuen Mauslinien kann der Einfluss, des von verschiedenen Zelltypen exprimierte IFN γ , bei der EAE-Pathogenese näher definiert werden.

Um die Rolle des von unterschiedlichen Zelltypen gebildeten IFN γ in der Immunabwehr von Pathogenen zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neues Mausmodell generiert werden, in dem eine Zelltyp-spezifische Rekonstitution der IFN γ Expression ermöglicht wird. Hierzu wurde eine definierte Mutation des genomischen IFN γ -Lokus von murinen ES Zellen, mittels zielgerichteten Mutagenese (*Gene-Targeting*) durchgeführt. Das klonierte Targeting-Konstrukt (Dr. Zoe Waibler und Sven Flindt, unpubliziert) soll nach Insertion in das Genom von ES Zellen und der anschließenden Generierung transgener Tiere, die Expression von IFN γ unterbinden. Zu diesem Zweck enthält der Targeting-Vektor eine durch loxP-Sequenzen flankierte promotorlose TRAP-Kassette (Dr. Klaus Pfeffer, Universität Düsseldorf, unpubliziert), welche auf dem entsprechenden Allel zu einer Inhibierung der IFN γ -Expression führt. Die TRAP-Kassette enthält unmittelbar vor dem promotorlosen *LacZ*-Gen eine *splice*-Erkennungssequenz, eine Sequenz der Exon-Intron-Grenzen, welche das *splicing* von mRNA vermittelt. Nach Aktivierung der Transkription am endogenen Promoters wird ein Fusions-Transkript gebildet, dass die 5'-liegende codierende Sequenz des betreffenden Gens und des Reportergens beinhaltet und somit das Expressionsmuster des Zielgens bestimmt werden kann (Stanford, W. L. *et al.*, 2001). Da die Insertion der TRAP-Kassette in einem Intron geschieht, ist ein Nachteil dieser Methode, dass alternatives *splicing* zu einer veränderten Expression des WT-Transkripts oder zu einem hypomorphen Allel führen könnten (McClive, P. *et al.*, 1998). Bereits in heterozygoten Tieren kann durch das in die TRAP-Kassette integrierte Reportergen *lacZ*, das Expressionsmuster von IFN γ in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben

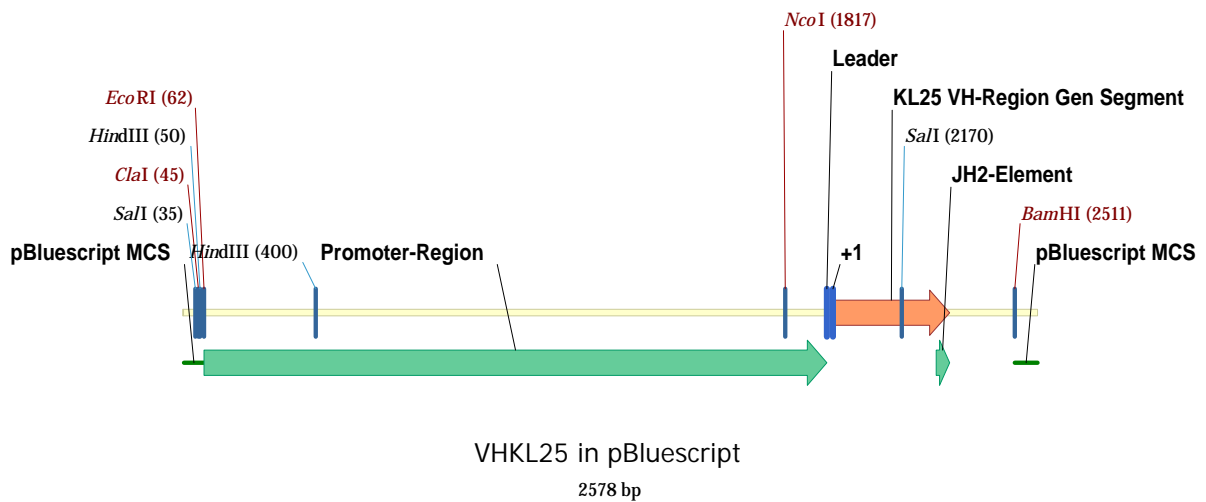
analysiert werden. In homozygot transgenen Tieren ist die IFN γ Expression vollständig unterbrochen, während die Zell- bzw. Gewebe-spezifische Expression von IFN γ durch Verkreuzung mit verschiedenen konditionell Cre-exprimierenden Mäusen erreicht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das klonierte und durch analytische Restriktionen und Sequenzierung verifizierte Targeting-Konstrukt, mittels Elektroporation stabil in ES Zellen eingebracht werden. Die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in den genomischen IFN γ Lokus wurde durch eine spezifische *screening*-PCR verifiziert. Insgesamt konnten hierbei 4 unabhängige ES Zellklone identifiziert werden, die das Targeting-Konstrukt in den IFN γ -Lokus integriert haben. Die notwendige Überprüfung der korrekten Integration des Targeting-Konstrukts durch Southern Blot dauert zurzeit noch an. Parallel dazu wurde die von loxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette in positiven ES Zell-Klonen durch transiente Expression der Cre-Rekombinase deletiert und durch Verwendung einer spezifischen PCR verifiziert. Hierbei konnten zunächst 5 Subklone identifiziert werden, in denen die Neomycin-Resistenz-Kassette deletiert wurde. Der Subklon 7_22_37 wurde anschließend am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig in C57Bl/6 Blastozysten mikroinjiziert. Nach Generierung 11 chimärer Mäuse konnte durch Verpaarung mit WT-Tieren die erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens erreicht werden und somit ein vollständig transgener Nachkomme erzeugt werden. Der Nachweis der erfolgreichen Keimbahntransmission wurde zunächst durch eine spezifische PCR erbracht, sollte jedoch durch Southern Blot verifiziert werden. Zur Generierung weiterer transgener Tiere dauern die Verpaarungen weiter an. Transgene Tiere sind zunächst heterozygot für den mutierten IFN γ -Lokus, wobei schon mit Hilfe dieser Tiere das Expressionsmuster von IFN γ in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben analysiert werden kann. Die Verpaarung heterozygoter Tiere untereinander führt dann zu homozygot transgenen Tieren in denen die IFN γ Expression vollständig unterbrochen ist. Die Zell- bzw. Gewebe-spezifische Expression von IFN γ kann anschließend durch Verkreuzung mit verschiedenen konditionell Cre-exprimierenden Mäusen erreicht werden. Unter Verwendung von z.B. CD-4Cre (Lee, P. P. *et al.*, 2001) oder CD19-Cre Mäusen (Rickert, R. C. *et al.*, 1997) könnte somit die Expression von IFN γ in T bzw. B Zellen erreicht werden. Mit Hilfe der LysMcre-Mauslinie (Clausen, B. E. *et al.*, 1999) würde die IFN γ Expression in Zellen der myeloiden Linie, wie Makrophagen und Monozyten induziert.

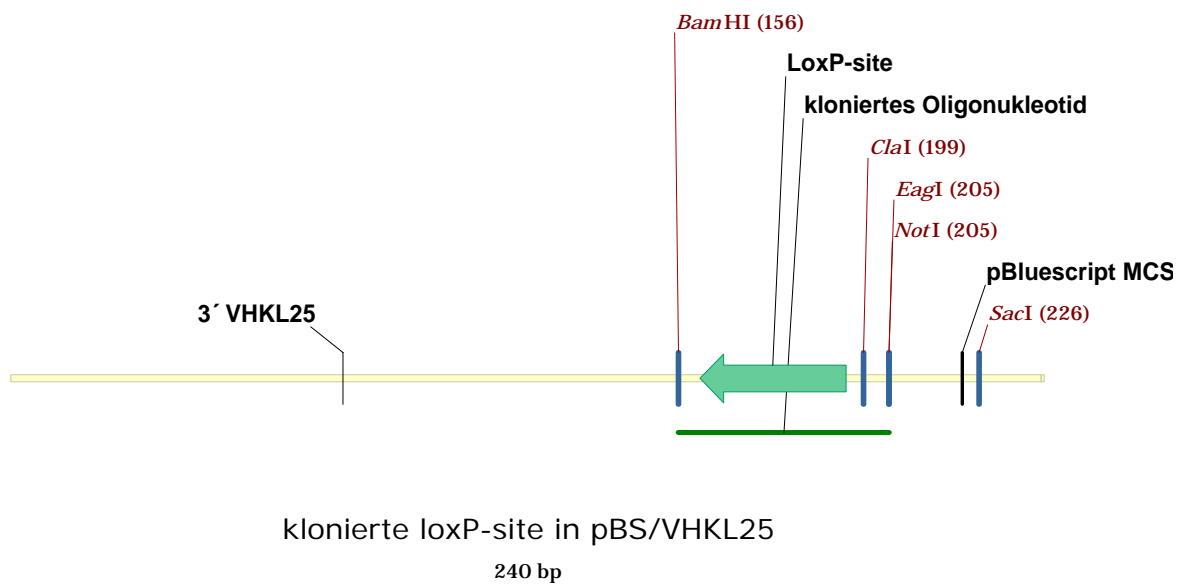
10 Anhang

Schematische Darstellung von Sequenzierungsergebnissen verschiedener Klonierungen zur Herstellung des Targetingkonstruktes für die Generierung der V_HKL25/V_H6H4flox-Maus (vgl. Kap. 8.1.2).

A



B



EcoRI (43)
EcoRV (39)
HindIII (31)
zerstörte ClaI-site
pBlueScript MCS
SalI (15)
XhoI (9)

5' VHKL25

HindIII (381)

400 bp

VH6H4 Promoterregion

6H4 VH-Region Gen Segment

NcoI (496)

PstI (458)

PstI (147)

PstI (18)

EcoRI (1941)

EcoRI (2481)

HindIII (2819)

VHKL25 Promoterregion

ApaLI (3952)

NcoI (4236)

KL25 VH-Region Gen Segment

BamHI (4930)

loxP-site

ClaI (4973)

VH6H4/VHKL25/loxP in pBluescript

4984 bp

Teil der Neomycin-Kassette

6H4 VH-Region

loxP site

EcoRI (254)

HindIII (575)

EcoRI (541)

NcoI (1075)

HindIII (2518)

HindIII (2856)

KL25 VH-Region

loxP site

SHA

NcoI (4273)

BamHI (4968)

BamHI (5853)

NotI (5872)

Switch-Cassette in piVHL2neo

5877 bp

11 Quellen- und Literaturverzeichnis

1. Adelstein, S., Pritchard-Briscoe, H., Anderson, T. A., Crosbie, J., Gammon, G., Loblay, R. H., Basten, A., and Goodnow, C. C. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* 251[4998], 1223-1225. 8-3-1991.
2. Aggarwal, B. B. and Natarajan, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur.Cytokine Netw.* 7[2], 93-124. 1996.
3. Aguzzi, A. and Heikenwalder, M. Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity.* 22[2], 145-154. 2005.
4. Aguzzi, A. and Sigurdson, C. J. Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat.Rev.Immunol.* 4[9], 725-736. 2004.
5. Ahmed, R. and Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272[5258], 54-60. 5-4-1996.
6. Akira, S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 15[1], 5-11. 2003.
7. Akira, S. and Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 4[7], 499-511. 2004.
8. Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214[5090], 764-766. 20-5-1967.
9. Andersson, A., Dai, W. J., Di Santo, J. P., and Brombacher, F. Early IFN-gamma production and innate immunity during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of NK cells. *J.Immunol.* 161[10], 5600-5606. 15-11-1998.
10. Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G. P., Meeker, H. C., Kascak, R., Kascak, R., Carp, R. I., and Wisniewski, T. Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J.Clin.Invest* 108[5], 703-708. 2001.
11. Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 563-591. 1997.
12. Bach, P., Kamphuis, E., Odermatt, B., Sutter, G., Buchholz, C. J., and Kalinke, U. Vesicular stomatitis virus glycoprotein displaying retrovirus-like particles induce a type I IFN receptor-dependent switch to neutralizing IgG antibodies. *J.Immunol.* 178[9], 5839-5847. 1-5-2007.

13. Bachmann, M. F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur.J.Immunol.* 25[12], 3445-3451. 1995.
14. Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 235-270. 1997.
15. Balachandran, S., Thomas, E., and Barber, G. N. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 432[7015], 401-405. 18-11-2004.
16. Banks, T. A., Rouse, B. T., Kerley, M. K., Blair, P. J., Godfrey, V. L., Kuklin, N. A., Bouley, D. M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M. L. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J.Immunol.* 155[4], 1685-1693. 15-8-1995.
17. Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Szelin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J.Exp.Med.* 195[4], 507-516. 18-2-2002.
18. Barchet, W., Krug, A., Cella, M., Newby, C., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pekosz, A., and Colonna, M. Dendritic cells respond to influenza virus through. *Eur.J.Immunol.* 35[1], 236-242. 2005.
19. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46[3], 417-428. 1-8-1986.
20. Beekes, M. and McBride, P. A. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci.Lett.* 278[3], 181-184. 14-1-2000.
21. Betmouni, S., Perry, V. H., and Gordon, J. L. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74[1], 1-5. 1996.
22. Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389[6646], 69-73. 4-9-1997.
23. Blobel, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90[4], 589-592. 22-8-1997.
24. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 749-795. 1997.
25. Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a

- sequence motif related to the death domain. *J.Biol.Chem.* 270[14], 7795-7798. 7-4-1995.
26. Bopst, M., Garcia, I., Guler, R., Ollerros, M. L., Rulicke, T., Muller, M., Wyss, S., Frei, K., Le, Hir M., and Eugster, H. P. Differential effects of TNF and LTalpha in the host defense against *M. bovis* BCG. *Eur.J.Immunol.* 31[6], 1935-1943. 2001.
 27. Branca, A. A. and Baglioni, C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature* 294[5843], 768-770. 24-12-1981.
 28. Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93[23], 13148-13151. 12-11-1996.
 29. Brandt, V. L. and Roth, D. B. V(D)J recombination: how to tame a transposase. *Immunol.Rev.* 200, 249-260. 2004.
 30. Braun, D., Caramalho, I., and Demengeot, J. IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int.Immunol.* 14[4], 411-419. 2002.
 31. Brown, K. L., Stewart, K., Ritchie, D. L., Mabbott, N. A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W. I., and Bruce, M. E. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat.Med.* 5[11], 1308-1312. 1999.
 32. Browning, J. L., Sizing, I. D., Lawton, P., Bourdon, P. R., Rennert, P. D., Majeau, G. R., Ambrose, C. M., Hession, C., Miatkowski, K., Griffiths, D. A., Ngam-ek, A., Meier, W., Benjamin, C. D., and Hochman, P. S. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J.Immunol.* 159[7], 3288-3298. 1-10-1997.
 33. Buchmeier, N. A., Libby, S. J., Xu, Y., Loewen, P. C., Switala, J., Guiney, D. G., and Fang, F. C. DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *J.Clin.Invest* 95[3], 1047-1053. 1995.
 34. Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J. J., Ironside, J. W., Jellinger, K., and . Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.* 5[4], 459-466. 1995.
 35. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguët, M., and Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73[7], 1339-1347. 2-7-1993.
 36. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguët, M., and Weissmann, C. Normal development and

behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356[6370], 577-582. 16-4-1992.

37. Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J.Clin.* 26[2], 119-121. 1976.
38. Cantin, E., Tanamachi, B., and Openshaw, H. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J.Virol.* 73[4], 3418-3423. 1999a.
39. Cantin, E., Tanamachi, B., Openshaw, H., Mann, J., and Clarke, K. Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. *J.Virol.* 73[6], 5196-5200. 1999b.
40. Casola, S., Cattoretti, G., Uyttersprot, N., Koralov, S. B., Seagal, J., Hao, Z., Waisman, A., Egert, A., Ghitza, D., and Rajewsky, K. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103[19], 7396-7401. 9-5-2006.
41. Caughey, B. and Baron, G. S. Prions and their partners in crime. *Nature* 443[7113], 803-810. 19-10-2006.
42. Chapman, G. A., Moores, K., Harrison, D., Campbell, C. A., Stewart, B. R., and Strijbos, P. J. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J.Neurosci.* 20[15], RC87. 1-8-2000.
43. Charan, S. and Zinkernagel, R. M. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J.Immunol.* 136[8], 3057-3061. 15-4-1986.
44. Chatterji, M., Tsai, C. L., and Schatz, D. G. New concepts in the regulation of an ancient reaction: transposition by RAG1/RAG2. *Immunol.Rev.* 200, 261-271. 2004.
45. Chavarria, A. and cocer-Varela, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun.Rev.* 3[4], 251-260. 2004.
46. Chen, G. and Goeddel, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296[5573], 1634-1635. 31-5-2002.
47. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81[4], 505-512. 19-5-1995.
48. Chowdhury, D. and Sen, R. Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol.Rev.* 200, 182-196. 2004.

49. Clarke, M. C. and Haig, D. A. Multiplication of scrapie agent in mouse spleen. *Res.Vet.Sci.* 12[2], 195-197. 1971.
50. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8[4], 265-277. 1999.
51. Collinge, J. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum.Mol.Genet.* 6[10], 1699-1705. 1997.
52. Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat.Immunol.* 5[12], 1219-1226. 2004.
53. Coro, E. S., Chang, W. L., and Baumgarth, N. Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J.Immunol.* 176[7], 4343-4351. 1-4-2006.
54. Creutzfeldt, H. G. On a particular focal disease of the central nervous system (preliminary communication), 1920. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.* 3[1-2], 3-25. 1989.
55. de Almeida, C. J., Chiarini, L. B., da Silva, J. P., PM, E. Silva, Martins, M. A., and Linden, R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J.Leukoc.Biol.* 77[2], 238-246. 2005.
56. De, Togni P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., Shornick, L. P., Strauss-Schoenberger, J., and . Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264[5159], 703-707. 29-4-1994.
57. Delhay, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., and Michiels, T. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103[20], 7835-7840. 16-5-2006.
58. Delves, P. J. and Roitt, I. M. The immune system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343[1], 37-49. 6-7-2000a.
59. Delves, P. J. and Roitt, I. M. The immune system. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343[2], 108-117. 13-7-2000b.
60. Dietzschold, B. and Rupprecht, C. E. Fu Z. F. und Koprowski H. *Rhabdoviruses In* Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. (ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1137-1159. . *Virology* . 1996.
61. Eklund, C. M., Kennedy, R. C., and Hadlow, W. J. Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J.Infect.Dis.* 117[1], 15-22. 1967.

62. Enari, M., Flechsig, E., and Weissmann, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98[16], 9295-9299. 31-7-2001.
63. Ermolaeva, M. A., Michallet, M. C., Papadopoulou, N., Utermohlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J., and Pasparakis, M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat.Immunol.* 9[9], 1037-1046. 2008.
64. Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D. I., Enver, T., Ley, T. J., and Groudine, M. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* 9[18], 2203-2213. 15-9-1995.
65. Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schreiber, R., Mak, T. W., and Bloom, B. R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 2[6], 561-572. 1995.
66. Ford, M. J., Burton, L. J., Morris, R. J., and Hall, S. M. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113[1], 177-192. 2002.
67. Forger, J. M., III, Bronson, R. T., Huang, A. S., and Reiss, C. S. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system. *J.Virol.* 65[9], 4950-4958. 1991.
68. Fu, Y. X. and Chaplin, D. D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev.Immunol.* 17, 399-433. 1999.
69. Fu, Y. X., Molina, H., Matsumoto, M., Huang, G., Min, J., and Chaplin, D. D. Lymphotoxin-alpha (LTalpha) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J.Exp.Med.* 185[12], 2111-2120. 16-6-1997.
70. Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D., and Prusiner, S. B. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85[18], 6617-6621. 1988.
71. Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M., and Aguzzi, A. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* 31[1], 25-34. 19-7-2001.
72. Goeringer, G. C. and Vidic, B. The embryogenesis and anatomy of Waldeyer's ring. *Otolaryngol.Clin.North Am.* 20[2], 207-217. 1987.
73. Goetz, F. W., Planas, J. V., and Mackenzie, S. Tumor necrosis factors. *Dev.Comp Immunol.* 28[5], 487-497. 3-5-2004.

74. Gommerman, J. L. and Browning, J. L. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat.Rev.Immunol.* 3[8], 642-655. 2003.
75. Goodnow, C. C. Chance encounters and organized rendezvous. *Immunol.Rev.* 156, 5-10. 1997.
76. Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St, Groth B., and Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435[7042], 590-597. 2-6-2005.
77. Greenberg, S. and Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14[1], 136-145. 2002.
78. Griffith, J. S. Self-replication and scrapie. *Nature* 215[5105], 1043-1044. 2-9-1967.
79. Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73[6], 1155-1164. 18-6-1993.
80. Guillemin, G. J. and Brew, B. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J.Leukoc.Biol.* 75[3], 388-397. 2004.
81. Halverson, R., Torres, R. M., and Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat.Immunol.* 5[6], 645-650. 2004.
82. Hangartner, L., Senn, B. M., Ledermann, B., Kalinke, U., Seiler, P., Bucher, E., Zellweger, R. M., Fink, K., Odermatt, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100[22], 12883-12888. 28-10-2003.
83. Hardy, R. R. and Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annu.Rev.Immunol.* 19, 595-621. 2001.
84. Harmsen, A., Kusser, K., Hartson, L., Tighe, M., Sunshine, M. J., Sedgwick, J. D., Choi, Y., Littman, D. R., and Randall, T. D. Cutting edge: organogenesis of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) occurs independently of lymphotoxin-alpha (LT alpha) and retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma, but the organization of NALT is LT alpha dependent. *J.Immunol.* 168[3], 986-990. 1-2-2002.
85. Head, M. W. and Ironside, J. W. Inhibition of prion-protein conversion: a therapeutic tool? *Trends Microbiol.* 8[1], 6-8. 2000.

86. Healy, J. I. and Goodnow, C. C. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16, 645-670. 1998.
87. Hehlgans, T. and Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115[1], 1-20. 2005.
88. Heppner, F. L. and Aguzzi, A. Recent developments in prion immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* 16[5], 594-598. 2004.
89. Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P., and Aguzzi, A. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat.Med.* 7[9], 976-977. 2001a.
90. Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294[5540], 178-182. 5-10-2001b.
91. Heppner, F. L., Prinz, M., and Aguzzi, A. Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells. *Prog.Brain Res.* 132, 737-750. 2001c.
92. Herberman, R. B., Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D. S., Kung, H. F., and Pestka, S. Effect of human recombinant interferon on cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and monocytes. *Cell Immunol.* 67[1], 160-167. 1982.
93. Hickey, W. F., Hsu, B. L., and Kimura, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J.Neurosci.Res.* 28[2], 254-260. 1991.
94. Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Pelanda, R., and Reth, M. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103[37], 13789-13794. 12-9-2006.
95. Horiuchi, M. and Caughey, B. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* 18[12], 3193-3203. 15-6-1999.
96. Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 4[4], 387-396. 1996a.
97. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84[2], 299-308. 26-1-1996b.
98. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81[4], 495-504. 19-5-1995.

99. Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E., and MacPherson, G. G. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J.Gen.Virol.* 83[Pt 1], 267-271. 2002.
100. Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259[5102], 1742-1745. 19-3-1993.
101. Hultgren, O., Eugster, H. P., Sedgwick, J. D., Korner, H., and Tarkowski, A. TNF/lymphotoxin-alpha double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *J.Immunol.* 161[11], 5937-5942. 1-12-1998.
102. ISAACS, A. and LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 147[927], 258-267. 12-9-1957.
103. Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R., and Graham, N. M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 84[3], 223-243. 1997.
104. Jegu, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19[2], 225-234. 2003.
105. Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., and Beutler, B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat.Immunol.* 6[6], 565-570. 2005.
106. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., and Gratzl, M. *Histologie.* 2002. Berlin, Springer.
107. Kaeser, P. S., Klein, M. A., Schwarz, P., and Aguzzi, A. Efficient lymphoreticular prion propagation requires PrP(c) in stromal and hematopoietic cells. *J.Virol.* 75[15], 7097-7106. 2001.
108. Kaiser-Schulz, G., Heit, A., Quintanilla-Martinez, L., Hammerschmidt, F., Hess, S., Jennen, L., Rezaei, H., Wagner, H., and Schatzl, H. M. Polylactide-Coglycolide Microspheres CoEncapsulating Recombinant Tandem Prion Protein with CpG-Oligonucleotide Break Self-Tolerance to Prion Protein in Wild-Type Mice and Induce CD4 and CD8 T Cell Responses. *J.Immunol.* 179[5], 2797-2807. 1-9-2007.
109. Kalinke, U., Bach, P., Konig, M., and Buchholz, C. J. Vaccination against prion diseases. *Discov.Med.* 6[31], 29-34. 2006.
110. Kalinke, U., Bucher, E. M., Ernst, B., Oxenius, A., Roost, H. P., Geley, S., Kofler, R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. The role of somatic mutation in the

generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus. *Immunity*. 5[6], 639-652. 1996.

111. Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R., and Kalinke, U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108[10], 3253-3261. 15-11-2006.
112. Kamradt, T. and Mitchison, N. A. Tolerance and autoimmunity. *N.Engl.J.Med.* 344[9], 655-664. 1-3-2001.
113. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 23[1], 19-28. 2005.
114. Kawai, T. and Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat.Immunol.* 7[2], 131-137. 2006.
115. Kawai, T. and Akira, S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J.Biochem.(Tokyo)* 141[2], 137-145. 2007.
116. Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat.Immunol.* 6[10], 981-988. 2005.
117. Kawakami, T., Matsumoto, M., Sato, M., Harada, H., Taniguchi, T., and Kitagawa, M. Possible involvement of the transcription factor ISGF3 gamma in virus-induced expression of the IFN-beta gene. *FEBS Lett.* 358[3], 225-229. 30-1-1995.
118. Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K., and Tateishi, J. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J.Virol.* 65[11], 6292-6295. 1991.
119. Kiyono, H. and Fukuyama, S. *Nat.Rev.Immunol.* 4[9], 699-710. 2004.
120. Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M., and Aguzzi, A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390[6661], 687-690. 18-12-1997.
121. Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat.Med.* 4[12], 1429-1433. 1998.
122. Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J.Exp.Med.* 202[5], 637-650. 5-9-2005.

123. Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., and Oesch, B. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390[6655], 74-77. 6-11-1997.
124. Kretzschmar, H. A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A., and Herms, J. Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch.Virol.Suppl* [16], 239-249. 2000.
125. Kronenberg, M. and Rudensky, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435[7042], 598-604. 2-6-2005.
126. Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon-alpha Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses. *Immunity*. 27[2], 240-252. 2007.
127. Kumaraguru, U., Davis, I. A., Deshpande, S., Tevethia, S. S., and Rouse, B. T. Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J.Immunol*. 166[2], 1066-1074. 15-1-2001.
128. Lagranderie, M., Nahori, M. A., Balazuc, A. M., Kiefer-Biasizzo, H., Lapa e Silva JR, Milon, G., Marchal, G., and Vargaftig, B. B. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of Mycobacterium bovis BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology* 108[3], 352-364. 2003.
129. Lamken, P., Lata, S., Gavutis, M., and Piehler, J. Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J.Mol.Biol*. 341[1], 303-318. 30-7-2004.
130. Lang, K. S., Navarini, A. A., Recher, M., Lang, P. A., Heikenwalder, M., Stecher, B., Bergthaler, A., Odermatt, B., Akira, S., Honda, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. MyD88 protects from lethal encephalitis during infection with vesicular stomatitis virus. *Eur.J.Immunol*. 37[9], 2434-2440. 2007.
131. Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., and Glimcher, L. H. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383[6595], 81-85. 5-9-1996.
132. Le, Bon A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D. F. Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*. 14[4], 461-470. 2001.
133. Le, Bon A., Thompson, C., Kamphuis, E., Durand, V., Rossmann, C., Kalinke, U., and Tough, D. F. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct

- stimulation of B and T cells by type I IFN. *J.Immunol.* 176[4], 2074-2078. 15-2-2006.
134. Lee, B. J., Santee, S., Von, Gesjen S., Ware, C. F., and Sarawar, S. R. Lymphotoxin-alpha-deficient mice can clear a productive infection with murine gammaherpesvirus 68 but fail to develop splenomegaly or lymphocytosis. *J.Virol.* 74[6], 2786-2792. 2000.
135. Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R., and Wilson, C. B. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity.* 15[5], 763-774. 2001.
136. Leist, T. P., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Aguet, M., and Zinkernagel, R. M. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J.Immunol.* 138[7], 2278-2281. 1-4-1987.
137. Lin, X., Ma, X., Rodriguez, M., Feng, X., Zoecklein, L., Fu, Y. X., and Roos, R. P. Membrane lymphotoxin is required for resistance to Theiler's virus infection. *Int.Immunol.* 15[8], 955-962. 2003.
138. Linker, R., Lee, D. H., Siglienti, I., and Gold, R. Is there a role for neurotrophins in the pathology of multiple sclerosis? *J.Neurol.* 254 Suppl 1, I33-I40. 2007.
139. Lu, B., Ebensperger, C., Dembic, Z., Wang, Y., Kvatyuk, M., Lu, T., Coffman, R. L., Pestka, S., and Rothman, P. B. Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95[14], 8233-8238. 7-7-1998.
140. Lund, F. E., Partida-Sanchez, S., Lee, B. O., Kusser, K. L., Hartson, L., Hogan, R. J., Woodland, D. L., and Randall, T. D. Lymphotoxin-alpha-deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza. *J.Immunol.* 169[9], 5236-5243. 1-11-2002.
141. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., and Flavell, R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101[15], 5598-5603. 13-4-2004.
142. Lutfalla, G., Gardiner, K., Proudhon, D., Vielh, E., and Uze, G. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J.Biol.Chem.* 267[4], 2802-2809. 5-2-1992.
143. Mabbott, N. A., Mackay, F., Minns, F., and Bruce, M. E. Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat.Med.* 6[7], 719-720. 2000.

144. Mabbott, N. A. and MacPherson, G. G. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat.Rev.Microbiol.* 4[3], 201-211. 2006.
145. MacEwan, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 14[6], 477-492. 2002.
146. Mackay, F. and Browning, J. L. Turning off follicular dendritic cells. *Nature* 395[6697], 26-27. 3-9-1998.
147. Mackay, F., Majeau, G. R., Lawton, P., Hochman, P. S., and Browning, J. L. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur.J.Immunol.* 27[8], 2033-2042. 1997.
148. Malmgaard, L., Salazar-Mather, T. P., Lewis, C. A., and Biron, C. A. Promotion of alpha/beta interferon induction during in vivo viral infection through alpha/beta interferon receptor/STAT1 system-dependent and -independent pathways. *J.Virol.* 76[9], 4520-4525. 2002.
149. Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J.Exp.Med.* 189[3], 521-530. 1-2-1999.
150. Martinon, F. and Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26[8], 447-454. 2005.
151. Matsumoto, M., Lo, S. F., Carruthers, C. J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D. R., Martin, S. M., Geha, R. S., Nahm, M. H., and Chaplin, D. D. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature* 382[6590], 462-466. 1-8-1996.
152. McClive, P., Pall, G., Newton, K., Lee, M., Mullins, J., and Forrester, L. Gene trap integrations expressed in the developing heart: insertion site affects splicing of the PT1-ATG vector. *Dev.Dyn.* 212[2], 267-276. 1998.
153. McGowan, J. P. Scrapie in sheep. **5**, 365-375. 1922. *Scott J.Agric.*
154. Mebius, R. E. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat.Rev.Immunol.* 3[4], 292-303. 2003.
155. Mebius, R. E. and Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat.Rev.Immunol.* 5[8], 606-616. 2005.
156. Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8[10], 452-456. 2000.

157. Melamed, D., Benschop, R. J., Cambier, J. C., and Nemazee, D. Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell* 92[2], 173-182. 23-1-1998.
158. Michallet, M. C., Meylan, E., Ermolaeva, M. A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G., Konig, M., Kalinke, U., Pasparakis, M., and Tschopp, J. TRADD Protein Is an Essential Component of the RIG-like Helicase Antiviral Pathway. *Immunity*. 28[5], 651-661. 2008.
159. Min, W., Pober, J. S., and Johnson, D. R. Interferon induction of TAP1: the phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN-alpha/beta and the IFN-gamma signal-transduction pathways. *Circ.Res.* 83[8], 815-823. 19-10-1998.
160. Miyoshi, K., Harter, D. H., and Hsu, K. C. Neuropathological and immunofluorescence studies of experimental vesicular stomatitis virus encephalitis in mice. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 30[2], 266-277. 1971.
161. Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A., and Weissmann, C. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288[5469], 1257-1259. 19-5-2000.
162. Mor, F. and Cohen, I. R. How special is a pathogenic CNS autoantigen? Immunization to many CNS self-antigens does not induce autoimmune disease. *J.Neuroimmunol.* 174[1-2], 3-11. 2006.
163. Mould, D. L., Dawson, A. M., and Rennie, J. C. Very early replication of scrapie in lymphocytic tissue. *Nature* 228[5273], 779-780. 21-11-1970.
164. Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264[5167], 1918-1921. 24-6-1994.
165. Muraro, P. A., Bonanni, L., Mazzanti, B., Pantalone, A., Traggiai, E., Massacesi, L., Vergelli, M., and Gambi, D. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J.Neuroimmunol.* 127[1-2], 149-159. 2002.
166. Murphy, M., Walter, B. N., Pike-Nobile, L., Fanger, N. A., Guyre, P. M., Browning, J. L., Ware, C. F., and Epstein, L. B. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death.Differ.* 5[6], 497-505. 1998.
167. Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., and Taraboulos, A. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J.Biol.Chem.* 272[10], 6324-6331. 7-3-1997.

168. Nemazee, D. and Hogquist, K. A. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr.Opin.Immunol.* 15[2], 182-189. 2003.
169. Nikles, D., Bach, P., Boller, K., Merten, C. A., Montrasio, F., Heppner, F. L., Aguzzi, A., Cichutek, K., Kalinke, U., and Buchholz, C. J. Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP. *J.Virol.* 79[7], 4033-4042. 2005.
170. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., and . A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40[4], 735-746. 1985.
171. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and . Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90[23], 10962-10966. 1-12-1993.
172. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J.Exp.Med.* 184[4], 1397-1411. 1-10-1996.
173. Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., and Prusiner, S. B. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412[6848], 739-743. 16-8-2001.
174. Petricoin, E. F., III, Ito, S., Williams, B. L., Audet, S., Stancato, L. F., Gamero, A., Clouse, K., Grimley, P., Weiss, A., Beeler, J., Finbloom, D. S., Shores, E. W., Abraham, R., and Larner, A. C. Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signalling. *Nature* 390[6660], 629-632. 11-12-1997.
175. Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M., and Mak, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73[3], 457-467. 7-5-1993.
176. Pichlmair, A. and Reis e Sousa. Innate recognition of viruses. *Immunity.* 27[3], 370-383. 2007.
177. Plakhov, I. V., Arlund, E. E., Aoki, C., and Reiss, C. S. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* 209[1], 257-262. 10-5-1995.

178. Prakken, B. J., van der, Zee R., Anderton, S. M., van Kooten, P. J., Kuis, W., and van, Eden W. Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94[7], 3284-3289. 1-4-1997.
179. Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M. A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K., and Aguzzi, A. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99[2], 919-924. 22-1-2002.
180. Proietti, E., Bracci, L., Puzelli, S., Di, Pucchio T., Sestili, P., De, Vincenzi E., Venditti, M., Capone, I., Seif, I., De, Maeyer E., Tough, D., Donatelli, I., and Belardelli, F. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J.Immunol.* 169[1], 375-383. 1-7-2002.
181. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216[4542], 136-144. 9-4-1982.
182. Publicover, J., Ramsburg, E., Robek, M., and Rose, J. K. Rapid pathogenesis induced by a vesicular stomatitis virus matrix protein mutant: viral pathogenesis is linked to induction of tumor necrosis factor alpha. *J.Virol.* 80[14], 7028-7036. 2006.
183. Ramsburg, E., Publicover, J., Buonocore, L., Poholek, A., Robek, M., Palin, A., and Rose, J. K. A vesicular stomatitis virus recombinant expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces enhanced T-cell responses and is highly attenuated for replication in animals. *J.Virol.* 79[24], 15043-15053. 2005.
184. Rehberg, E., Kelder, B., Hoal, E. G., and Pestka, S. Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons. *J.Biol.Chem.* 257[19], 11497-11502. 10-10-1982.
185. Reiss, C. S., Plakhov, I. V., and Komatsu, T. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 855, 751-761. 30-11-1998a.
186. Reiss, C. S., Plakhov, I. V., and Komatsu, T. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 855, 751-761. 30-11-1998b.
187. Rickert, R. C., Roes, J., and Rajewsky, K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 25[6], 1317-1318. 15-3-1997.
188. Robanus-Maandag, E., Dekker, M., van, der, V, Carrozza, M. L., Jeanny, J. C., Dannenberg, J. H., Berns, A., and te, Riele H. p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev.* 12[11], 1599-1609. 1-6-1998.

189. Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J., and Rose, J. K. Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J.Virol.* 73[5], 3723-3732. 1999.
190. Roost, H. P., Haag, A., Burkhart, C., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Mapping of the dominant neutralizing antigenic site of a virus using infected cells. *J.Immunol.Methods* 189[2], 233-242. 5-2-1996.
191. Rothfuchs, A. G., Kreuger, M. R., Wigzell, H., and Rottenberg, M. E. Macrophages, CD4+ or CD8+ cells are each sufficient for protection against Chlamydia pneumoniae infection through their ability to secrete IFN-gamma. *J.Immunol.* 172[4], 2407-2415. 15-2-2004.
192. Rudyk, H., Vasiljevic, S., Hennion, R. M., Birkett, C. R., Hope, J., and Gilbert, I. H. Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells. *J.Gen.Virol.* 81[Pt 4], 1155-1164. 2000.
193. Sabin, A. B. and Olitsky, P. K. Influence of Host Factors on Neuroinvasiveness of Vesicular Stomatitis Virus: I. Effect of Age on the Invasion of the Brain by Virus Instilled in the Nose. *J.Exp.Med.* 66[1], 15-34. 1-7-1937.
194. Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J., Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J.Biol.Chem.* 268[27], 20276-20284. 25-9-1993.
195. Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin.Microbiol.Rev.* 14[4], 778-809, table. 2001.
196. Sandberg, K., Eloranta, M. L., and Campbell, I. L. Expression of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and their relationship to IFN-alpha/beta-induced genes in lymphocytic choriomeningitis. *J.Virol.* 68[11], 7358-7366. 1994.
197. Scharton, T. M. and Scott, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.* 178[2], 567-577. 1-8-1993.
198. Schatz, D. G. V(D)J recombination. *Immunol.Rev.* 200, 5-11. 2004.
199. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400[6740], 173-177. 8-7-1999.
200. Schlissel, M. Allelic exclusion of immunoglobulin gene rearrangement and expression: why and how? *Semin.Immunol.* 14[3], 207-212. 2002.

201. Schneider, K., Potter, K. G., and Ware, C. F. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol.Rev.* 202, 49-66. 2004.
202. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* 75[2], 163-189. 2004.
203. Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23[24], 5080-5081. 25-12-1995.
204. Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Schwendener, R. A. Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophils in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur.J.Immunol.* 27[10], 2626-2633. 1997.
205. Sen, G. C. Viruses and interferons. *Annu.Rev.Microbiol.* 55, 255-281. 2001.
206. Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di, Rosa F., and Aloisi, F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am.J.Pathol.* 157[6], 1991-2002. 2000.
207. Sheehan, K. C., Lai, K. S., Dunn, G. P., Bruce, A. T., Diamond, M. S., Heutel, J. D., Dungo-Arthur, C., Carrero, J. A., White, J. M., Hertzog, P. J., and Schreiber, R. D. Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection. *J.Interferon Cytokine Res.* 26[11], 804-819. 2006.
208. Shimoda, M., Nakamura, T., Takahashi, Y., Asanuma, H., Tamura, S., Kurata, T., Mizuochi, T., Azuma, N., Kanno, C., and Takemori, T. Isotype-specific selection of high affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue. *J.Exp.Med.* 194[11], 1597-1607. 3-12-2001.
209. Sigurdsson B. Ride-a chronic encephalitis of sheep-with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. **110**, 341-354. 1954. *Br.Vet.J.*
210. Sigurdsson, E. M., Sy, M. S., Li, R., Scholtzova, H., Kascsak, R. J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Frangione, B., and Wisniewski, T. Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci.Lett.* 336[3], 185-187. 23-1-2003.
211. Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D., and Rajewsky, K. B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity.* 6[3], 225-233. 1997.
212. Spahn, T. W., Eugster, H. P., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. Role of lymphotoxin in experimental models of infectious diseases: potential benefits

- and risks of a therapeutic inhibition of the lymphotoxin-beta receptor pathway. *Infect.Immun.* 73[11], 7077-7088. 2005.
213. Spahn, T. W., Maaser, C., Eckmann, L., Heidemann, J., Luger, A., Newberry, R., Domschke, W., Herbst, H., and Kucharzik, T. The lymphotoxin-beta receptor is critical for control of murine *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Gastroenterology* 127[5], 1463-1473. 2004.
 214. Spiotto, M. T., Reth, M. A., and Schreiber, H. Genetic changes occurring in established tumors rapidly stimulate new antibody responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100[9], 5425-5430. 29-4-2003.
 215. Stanford, W. L., Cohn, J. B., and Cordes, S. P. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat.Rev.Genet.* 2[10], 756-768. 2001.
 216. Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81[4], 513-523. 19-5-1995.
 217. Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., and Macklis, J. D. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103[9], 3416-3421. 28-2-2006.
 218. Strengell, M., Julkunen, I., and Matikainen, S. IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J.Leukoc.Biol.* 76[2], 416-422. 2004.
 219. Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T., and Koyasu, S. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur.J.Immunol.* 33[10], 2666-2675. 2003.
 220. Takahashi, K., Kawai, T., Kumar, H., Sato, S., Yonehara, S., and Akira, S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J.Immunol.* 176[8], 4520-4524. 15-4-2006.
 221. Takeda, K. and Akira, S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 5[3], 143-153. 2003.
 222. Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 10[1], 39-49. 1999.
 223. Taki, S., Meiering, M., and Rajewsky, K. Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus. *Science* 262[5137], 1268-1271. 19-11-1993.
 224. Tang, C., Inman, M. D., van Rooijen, N., Yang, P., Shen, H., Matsumoto, K., and O'Byrne, P. M. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-

- mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J.Immunol.* 166[3], 1471-1481. 1-2-2001.
225. Thomas, K. R. and Capecchi M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51[3], 503-512. 1987.
226. Thomsen, A. R., Nansen, A., Andersen, C., Johansen, J., Marker, O., and Christensen, J. P. Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. *Int.Immunol.* 9[11], 1757-1766. 1997.
227. Thormar, H. Slow infections of the central nervous system. II. *Z.Neurol.* 199[3], 151-166. 1971.
228. Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J.Exp.Med.* 177[4], 1009-1020. 1-4-1993.
229. Torres, R. M. and Kühn, R. *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting.* Oxford University Press . 1997.
230. Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat.Genet.* 23[1], 99-103. 1999.
231. Tumanov, A. V., Kuprash, D. V., and Nedospasov, S. A. The role of lymphotoxin in development and maintenance of secondary lymphoid tissues. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14[3-4], 275-288. 2003.
232. Underhill, D. M. and Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* 14[1], 103-110. 2002.
233. van den Broek, M. F., Muller, U., Huang, S., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol.Rev.* 148, 5-18. 1995.
234. van den Pol, A. N., Dalton, K. P., and Rose, J. K. Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J.Virol.* 76[3], 1309-1327. 2002.
235. Waibler, Z., Anzaghe, M., Ludwig, H., Akira, S., Weiss, S., Sutter, G., and Kalinke, U. Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor independent type I interferon responses. *J.Virol.* 12-9-2007.
236. Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* 10[1], 45-65. 2003.

237. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., and Nussenzweig, M. C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301[5638], 1374-1377. 5-9-2003.
238. Ware, C. F., VanArsdale, T. L., Crowe, P. D., and Browning, J. L. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 198, 175-218. 1995.
239. Weissmann, C. The state of the prion. *Nat.Rev.Microbiol.* 2[11], 861-871. 2004.
240. Wekerle, H. et al. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trend Neuroscience* 9, 227.-271. 1986.
241. Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet.Rec.* 121[18], 419-420. 31-10-1987.
242. Welsch, U. and Sobotta, J. *Lehrbuch Histologie.* 1. Auflage. 2003. München, Urban und Fischer.
243. Wesemann, D. R., Qin, H., Kokorina, N., and Benveniste, E. N. TRADD interacts with STAT1-alpha and influences interferon-gamma signaling. *Nat.Immunol.* 5[2], 199-207. 2004.
244. WHEELOCK, E. F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149, 310-311. 16-7-1965.
245. White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 422[6927], 80-83. 6-3-2003.
246. Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347[9006], 921-925. 6-4-1996.
247. Wu, H. Y. and Russell, M. W. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect.Immun.* 61[1], 314-322. 1993.
248. Wu, Q., Wang, Y., Wang, J., Hedgeman, E. O., Browning, J. L., and Fu, Y. X. The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J.Exp.Med.* 190[5], 629-638. 6-9-1999.
249. Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K., and Fujita, T. Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J.Biochem.(Tokyo)* 120[1], 160-169. 1996.

250. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von, Schroetter C., Lopez, Garcia F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., and Wuthrich, K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97[1], 145-150. 4-1-2000.

251. Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S., and Lodish, H. F. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103[7], 2184-2189. 14-2-2006.

252. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 8[5], 591-599. 1998.

253. Zuercher, A. W., Coffin, S. E., Thurnheer, M. C., Fundova, P., and Cebra, J. J. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J.Immunol.* 168[4], 1796-1803. 15-2-2002.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin König
Geburtsdatum	13.02.1976
Geburtsort	Wiesbaden
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982 - 1986	Karl-Gärtner-Grundschule, Wiesbaden
1986 - 1992	Heinrich-von-Brentano-Gesamtschule, Hochheim a. M.
1992 - 1996	gymnasiale Oberstufe der Carlo-Schmid-Schule, Hochheim am Main
1996	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

11/1996 - 09/1997	Wehrdienst an der Fachschule des Heeres für Erziehung und Wirtschaft, Darmstadt
-------------------	---

Hochschulstudium

10/1997 - 06/2003	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Hauptfächer: Immunologie, Genetik, Mikrobiologie
-------------------	--

07/2002 - 06/2003	Diplomarbeit am Institut für Genetik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit dem Titel: „Auswirkungen der Überexpression der mTid-Splicevarianten auf die <i>hegdehog/patched</i> vermittelte Signaltransduktion in murinen Hautzellen.“ unter Leitung von PD Dr. U. Kurzik-Dumke
06/2003	Abschluss: Diplom-Biologe

Promotion

07/2003 – 06/2009	<p>Promotion am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Langen in der Abteilung Immunologie unter der Leitung von Dr. Ulrich Kalinke.</p> <p>Thema der Promotion: „Entwicklung neuer Mausmodelle zur Untersuchung von Infektionskrankheiten“.</p>
-------------------	---

13 Konferenzbeiträge

- 10/2003 International Prion Conference, München, “*Induction of prion-specific antibody responses using PrP-retroparticles*” (Poster)
- 10/2005 Prion 2005, International Conference, Düsseldorf, “*Generation of a new transgenic mouse model to study PrP-specific B cell tolerance*” (Poster)
- 9/2006 16th European Congress of Immunology, Paris “*Generation of a new transgenic mouse model to study PrP-specific B cell tolerance*” (Vortrag)

14 Publikationen

Kalinke, U., Bach, P., **König, M.**, Buchholz, C. J. *Vaccination against prion diseases*. Discov Med. 2006 Feb; 6(31): 29-34.

Michallet, M. C., Meylan, E., Ermolaeva, M. A., Vazquez, J., Pasparakis, M., **König, M.**, Kalinke, U. and Tschopp, J. *TRADD is an essential component of the RIG-like helicase (RLH) antiviral pathway*, Immunity. 28(5), 651-661. 2008.

Luisa Cervantes-Barragán, Ulrich Kalinke, Roland Züst, Boris Reizis, **Martin König**, Constantino López-Macías, Volker Thiel, and Burkhard Ludewig. *Type I interferon-mediated protection of macrophages and dendritic cells secures control of murine coronavirus infection*, The Journal of Immunology, 2009 Jan 15;182(2):1099-106

König, M., Frenz, T., Kremer, M., Detje, C., Sutter, G. and Kalinke, U. *Type I interferon receptor triggering of myeloid cells improves resistance against lethal VSV infections*, (Manuskript in Vorbereitung)

Schmidt, H., Heikenwälder, M., **König, M.**, Mildner, A., Aguzzi, A., Brück, W., Kalinke, U. and Prinz, M. *T-cell produced lymphotoxins tightly govern the anatomical structure and function of Nasal-associated lymphoid tissue (NALT)*, (Mauskript in Vorbereitung)